

Université de Montréal

**Étude du rôle biologique de l'interaction du
CD154 avec l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans la promotion de
la survie des cellules T**

Par Meriem Bachsais

Département de microbiologie-immunologie

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de doctorat (Ph.D)
en microbiologie-immunologie

Mai, 2019

© Meriem Bachsais, 2019

Université de Montréal

**Étude du rôle biologique de l'interaction du
CD154 avec l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans la promotion de
la survie des cellules T**

Par

Meriem Bachsais

A été évalué par un jury composé de :

Dr. Petronela Ancuta, président-rapporteur.

Dr. Walid Mourad, directeur de recherche.

Dr Fawzi Aoudjit, co-directeur.

Dr. Nathalie Arbour, Dr. Eric Boilard, membres du jury.

Résumé

Le CD154, est une glycoprotéine transmembranaire de type II appartenant à la famille des TNF (tumor necrosis factor). Il est exprimé de façon inductible et transitoire sur plusieurs types cellulaires. Il existe deux formes du CD154, membranaire (mCD154) et soluble (sCD154) qui forment une structure trimérique biologiquement active. Le CD154 a été initialement identifié pour son rôle important dans la réponse humorale thymodépendante suite à sa liaison avec son récepteur, le CD40. Il a été démontré par la suite, que le CD154 joue un rôle dans différentes réponses inflammatoires dont certaines peuvent conduire à des processus pathogènes de maladies inflammatoires chroniques et auto-immunes.

Depuis quelques années, des études ont montré que les intégrines $\alpha\text{IIb}\beta 3$, $\alpha\text{M}\beta 2$, $\alpha\text{v}\beta 3$ et $\alpha 5\beta 1$ sont de nouveaux récepteurs pour le CD154. Elles jouent un rôle important dans le contrôle de nombreux processus cellulaires tels que la prolifération et l'apoptose cellulaire. Cependant, le rôle biologique de l'interaction du CD154 avec ses récepteurs nouvellement identifiés reste peu étudié.

Les cellules T sont des cellules clés de la réponse immunitaire, leur survie et leur persistance constituent une signature caractéristique de nombreuses maladies inflammatoires et auto-immunes. Lors de ces dernières, les cellules T expriment des niveaux élevés d'intégrines $\beta 1$. Étant donné le rôle attribué aux intégrines et en particulier aux intégrines $\beta 1$, dans l'inhibition des événements apoptotiques dans les cellules T, nous étions intéressés d'étudier le rôle de l'interaction CD154 / $\alpha 5\beta 1$ dans la promotion de la survie des cellules T.

Dans cette étude, nous avons démontré que le sCD154 est capable de se lier spécifiquement à l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ exprimée par les cellules T, et que cette interaction inhibe l'apoptose cellulaire induite par Fas dans les lignées de cellules T suite à l'inhibition du clivage de la caspase-8. Nous avons également montré que l'effet anti-apoptotique induit par l'axe CD154/ $\alpha 5\beta 1$ n'était pas restreint au Fas seulement, mais était généralisé aux autres récepteurs de mort de la famille des TNF tel que le TRAIL et le TNF. Plus intéressant encore, nos résultats ont montré que la pré-incubation avec le sCD154 des cellules humaines T $\text{CD}3^+$, protège ces dernières de la mort induite par Fas. Enfin, nous avons montré que comme le sCD154, le mCD154 était capable d'inhiber la mort induite

via les différents récepteurs de mort Fas, TRAIL et TNF, mais seulement par un mécanisme cis-dépendant lorsque le CD154 et l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ sont exprimés à la surface d'une même cellule. Ces résultats soulignent l'importance de l'interaction CD154/ $\alpha 5 \beta 1$ dans la survie des cellules T et de ce fait, dans leurs rôles biologiques. Cette nouvelle observation inculpe davantage le CD154 et ses récepteurs les intégrines dans l'initiation, mais également dans la progression et la persistance des pathologies inflammatoires et auto-immunes en particulier. L'inhibition spécifique de cet axe peut représenter une cible thérapeutique potentielle dans le traitement des pathologies.

Mots-clés : CD154, intégrine, inflammation, survie cellulaire, maladies auto-immunes.

Abstract

CD154 is a type II glycoprotein belonging to the tumor necrosis factors (TNF). It's expressed in a transitory way on different cell types. There are two forms of CD154, membrane (mCD154) and soluble (sCD154). Both form are biologically active trimeric structure. CD154 has been identified on its role in the thymus dependent humoral response following its binding with its CD40 receptor. It has subsequently been shown that CD154 plays a role in various inflammatory responses, some of which may lead to pathogenic processes of chronic inflammatory and autoimmune diseases.

Recently, studies have shown that other α IIb β 3, α M β 2, α v β 3 and α 5 β 1 receptors belonging to the integrin family could interact with CD154. They play an important role in the control of many cellular processes such as cell proliferation and apoptosis. However, the biological role of the interaction of CD154 with its newly identified receptors remains poorly studied.

T lymphocytes are key cells in the immune response. Their survival and persistence is a characteristic signature of numerous inflammatory and autoimmune diseases. In these latter, T cells express high levels of β 1 integrins. Given the role attributed to integrins and in particular to β 1 integrins in the inhibition of apoptotic events in T cells, we were very interested in studying the role of the CD154 / α 5 β 1 interaction in promoting T cell survival.

In this study we have demonstrated that sCD154 is able to specifically bind to T-cell expressed α 5 β 1 integrin. This interaction inhibits Fas-induced apoptosis in Jurkat E6.1 and HUT-78 T cell lines following the inhibition of cleavage of caspase-8. We have also shown that the anti-apoptotic effect induced by the CD154 / α 5 β 1 axis was not restricted to Fas, but was generalized to other TNF-like death receptors such as TRAIL and TNF. More interestingly, our results showed that preincubation with sCD154 of previously activated human T CD3⁺ cells, protects them from Fas-induced death. Finally, we have shown that, like sCD154, mCD154 was able to inhibit death induced by the different death receptors Fas, TRAIL and TNF, but only by a cis-dependent mechanism when CD154 and α 5 β 1 are expressed at the same time surface of the same cells.

These results enhance the importance of the CD154 / α 5 β 1 interaction in the survival of T cells and thus in their biological roles. This new observation further induces CD154 and its

integrin receptors in initiation, but also in the progression and persistence of inflammatory and autoimmune pathologies, in particular. The specific inhibition of this axis may represent a potential therapeutic target in the treatment of pathologies.

Keywords: CD154, integrin, inflammation, cell survival, autoimmune diseases.

Table des matières

1. INTRODUCTION.....	1
1.1 Le CD154	3
1.1.1 Structure du CD154	3
1.1.2 Expression du CD154	4
1.2 Les différents récepteurs du CD154.....	4
1.2.1 Le CD40.....	4
1.2.2 Les intégrines α IIb β 3, α M β 2, α v β 3 et α 5 β 1	13
1.3 Interaction possible du CD154 avec plusieurs récepteurs en simultanée sur le même type cellulaire.....	49
1.4 Rôle de l'interaction du CD154 avec ses différents récepteurs dans les pathologies inflammatoires et autoimmunes	52
1.4.1 Rôle de l'interaction CD154/CD40	52
1.4.2 Rôle de l'interaction CD154/intégrines	62
2. HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS	64
3. L'INTERACTION DU CD154 AVEC L'INTÉGRINE ALPHA5BETA1 INHIBE LA MORT INDUITE PAR FAS DANS LES CELLULES T (ARTICLE # 1)	67
3.1 Mise en contexte.....	68
3.2 Contribution des co-auteurs.....	68
3.3 Résumé	69
4. LE CD154 INHIBE LA MORT DES CELLULES T PAR UNE INTERACTION CIS AVEC L'INTÉGRINE ALPHA5BETA1 (ARTICLE # 2).....	104
4.1 Mise en contexte.....	105

4.2	Contribution des co-auteurs.....	105
4.3	Resumé	106
5.	DISCUSSION	145
6.	PERSPECTIVES.....	157
7.	BIBIOGRAPHIE.....	160

Liste des tableaux

Tableau I: Les principaux intervenants du complexe d'adhérence.	21
Tableau II: Les récepteurs de mort et leurs ligands.	31
Tableau III: Propriétés de liaison du CD154 avec ses différents récepteurs	41

Liste des figures

1. Introduction

Figure 1: Structure du gène du CD154 humain	3
Figure 2: Structure du gène et de la protéine du CD40 humain	5
Figure 3: Signalisation induite par le CD40 suite à son association aux différentes protéines adaptatrices TRAFs et Jak 3	7
Figure 4: Interaction CD40/CD154	9
Figure 5: Rôle de l'interaction CD40/CD154 dans la production d'anticorps par les lymphocytes B lors de la réponse immunitaire.....	10
Figure 6: Rôle de l'interaction CD40/CD154 au niveau des cellules dendritique.	12
Figure 7: Les récepteurs de la famille des intégrines.....	14
Figure 8: Structure cristallographique d'une intégrine	16
Figure 9: Activation des intégrines.....	18
Figure 10: Régulation des fonctions cellulaires par les intégrines	22
Figure 11: Les voies de signalisation dépendantes des intégrines.....	25
Figure 12: Caractéristiques morphologiques de l'apoptose.....	27
Figure 13: Comparaison structurelle des pro-caspases et des différents groupes de caspases.....	28
Figure 14: Mécanisme d'activation des caspases.....	30
Figure 15: Les voies de signalisation apoptotiques extrinsèques et intrinsèques	33
Figure 16: Perturbation dans les interactions cellule-MEC et induction de l'anoïkose.....	36
Figure 17: La signalisation intégrines $\beta 1$ -Fak dans la survie cellulaire et la suppression de l'anoïkos.....	38
Figure 18: La liaison du CD154 avec $\alpha I I b \beta$	42
Figure 19: La liaison du CD154 à l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$	46
Figure 20: Liaison du CD154 à l'intégrine $\alpha M \beta 2$	48
Figure 21: Modèle d'interaction du CD154 avec différents récepteurs.....	50
Figure 22: L'interaction du CD154 avec différents récepteurs exprimés à la surface d'une même cellule.....	51

Figure 23: Rôle de l'interaction du CD154 dans les CEs, les SMCs et les plaquettes.....	54
Figure 24: Mécanismes d'action potentiels par lesquels le complexe CD40/CD154 contribue aux maladies auto-immunes.....	56
Figure 25: Rôle biologique du CD154 dans l'AR.....	58
Figure 26: Rôle du CD154 dans le SLE.....	60

2. L'interaction du CD154 avec l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ inhibe la mort induite par Fas dans les cellules T (article # 1)

Figure 1: Binding of sCD154 to Jurkat E6.1 T cells is $\alpha 5\beta 1$ -dependent.....	86
Figure 2: Soluble CD154 induces intracellular signaling in Jurkat E6.1 T cells.....	87
Figure 3: Soluble CD154 inhibits Fas-mediated cell death in Jurkat E6.1 T cell.....	88
Figure 4: Anti- $\alpha 5\beta 1$ Abs inhibit Fas-mediated cell death in Jurkat E6.1 T cells.....	89
Figure 5: Soluble CD154 inhibits Fas-mediated cell death in HUT78 T cells....	90
Figure 6: The CD154-mediated inhibition of Fas-induced apoptosis is regulated mainly by the PI-3K/Akt pathway but also by the p38 and the ERK1/2 signaling cascades.....	91
Figure 7: Soluble CD154-mediated inhibition of Fas-induced cell death does not influence Fas expression and is independent of de novo protein synthesis.....	92
Figure 8: Soluble CD154 inhibits Fas-mediated T cell death by inhibiting caspase-8 cleavage.....	93

3. Le CD154 inhibe la mort des cellules T par une interaction cis avec l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ (article # 2)

Figure 1: Soluble CD154 inhibits TRAIL- and TNF- α -mediated cell death in Jurkat E6.1 cells	134
Figure 2: Soluble CD154 inhibits Fas-mediated cell death in human activated CD3 ⁺ T cells.....	135
Figure 3: Soluble CD154 inhibits Fas-mediated cell death more importantly in human activated CD4 ⁺ T cells than CD8 ⁺ ones	136

Figure 4: Interaction of membrane-bound CD154 with integrin $\alpha 5\beta 1$ does not inhibit Fas-mediated cell death in Jurkat E6.1 cells and human T cells.	137
Figure 5: Jurkat E6.1 cells do not adhere to CD154-transfected HEK 293.....	138
Figure 6: CD154 expression on the surface of Jurkat E6.1 cells inhibits their Fas-, TRAIL- and TNF-mediated death response.....	139
Figure 7: Cis association between membrane-bound CD154 and $\alpha 5\beta 1$ on the surface of the same cell.....	140

Abréviations

Apaf-1: apoptotic protease-activating factor-1

AP-1: activator protein

APCs: antigen-presenting cell

APRIL: a proliferation-inducing ligand

BAFF: B-cell activating factor

CARD: caspase recruitment domain

Caspases: cysteinyl aspartate specific protease

CMH: major histocompatibility complex

CRE: cAMP response element

DAPK: death associated protein kinases

Dok1: docking protein 1

DISC: death-inducing signaling complex

FERM: Four-point-one protein, Ezrin, Radixin, Moesin

EGF: epidermal growth factor

Erk: extracellular regulated kinase

FADD: Fas-associated death domain

FAK: focal adhesion kinase

FGF: fibroblast growth factors

GM-CSF: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

Grb2: growth factor receptor-bound protein 2

ICAM-1: intercellular adhesion molecule 1

ICAP-1: integrin cytoplasmic domain associated protein-1

IL-: interleukine

IFN γ : interferon γ

JNK: c-Jun-NH(2)-terminal kinase

LFA-1: lymphocyte function-associated antigen 1

LIBS: ligand induced binding site

LPS: lipopolysaccharide TRAFs (TNFR associated factors)

MAPK: mitogen-activated protein kinase

MCP-1: monocyte chemoattractant protein-1

MEK: mitogen-activated protein kinase

MLCK: myosin light chain kinase

MLCP: myosin light-chain phosphatase

MIP-1 α : macrophage inflammatory protein-1 α

NF κ B: nuclear factor-kappa B

PAK: p21 activated kinase

PDGF: platelet-derived growth factor

PI4, 5P2: phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate

PI-3K: phosphoinositide 3-kinases

PMA: phorbol myristate acetate

PTB: phosphotyrosine binding

RANTES: Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed, and Secreted

ROCK: rho kinase

STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription

SAPK: stress-activated MAP kinases

SHARPIN: SHANK-associated RH domain interactor

SOS: son of sevenless

TNF-R: tumor necrosis factor receptor

VCAM-1: vascular cell adhesion molecule 1

Je dédie cette thèse à mon adorable ange Adam, mon mari Walid, mes parents Kamel et Malika, mon frère Hamza, mes sœurs Rym, Sissi et Yasmine, ma très chère tante Fatiha et mes anges Teyeb et Serine. Merci pour votre soutien continu et vos encouragements...

Remerciements

Je voudrais d'abord adresser toute ma gratitude à mon directeur Dr. Walid Mourad de m'avoir accueilli au sein laboratoire au CR-CHUM, merci à vous pour votre encadrement, votre soutien, votre disponibilité et pour tout ce que j'ai appris au cours de ces années. J'ai vraiment apprécié vous avoir comme directeur.

Ma reconnaissance va également à mon codirecteur Dr. Fazwi Aoudjit, merci pour votre disponibilité en tout temps, votre encadrement et votre aide précieuse.

Je remercie également Dr. Ghada Hassan, pour ta disponibilité, tu as toujours été là quand j'avais besoin d'aide, merci pour ton soutien et tes encouragements.

A mon ami Kossay Zaoui, pour ton soutien, tes encouragements, ta disponibilité, ton aide précieuse et tes nombreux conseils. A Hamid, Lamia, Macha, pour votre soutien et votre présence, Youcef, Lydia, Suzanne, Saly, Lyvia et Loubna pour tous les moments passés ensemble.

A mon adorable bébé Adam Alyan et mon mari Walid, aucun mots ne pourra décrire l'amour que je vous porte, merci Walid d'exister et d'être à mes côtés, tu as toujours été là pour me soutenir et m'encourager. Dieu vous garde et vous protège.

A mes parents Kamel et Malika, mon frère Hamza, mes sœurs Rym, Sissi et Yasmine, ma très chère tante Fatiha et mes anges Teyeb et Serine. Merci pour vous encouragements, votre présence et votre patience. C'est grâce à vous que je suis là aujourd'hui. Un grand merci à vous, que Dieu vous protège et vous garde en bonne santé.

1. Introduction

Notre organisme est constamment exposé à des substances étrangères, des agents infectieux, mais aussi à des agressions endogènes. La protection de ce dernier est assurée par le système immunitaire qui met en jeu deux processus inter connectés : l'immunité innée et l'immunité adaptative. L'interaction entre les cellules de l'immunité innée et adaptative est indispensable pour permettre une défense efficace de l'organisme. En effet, l'immunité innée, représente la première ligne de défense, elle assure une réponse très rapide mais non spécifique, qui fait intervenir les cellules comme: les monocytes, les macrophages, les cellules NK, les cellules dendritiques et les neutrophiles. Quant à elle, l'immunité adaptative représente la deuxième ligne de défense. Elle est plus lente car elle nécessite la mise en place de cellules effectrices qui sont spécifiquement adaptées pour éliminer l'agent pathogène. L'immunité adaptative déclenche deux types de réponses immunitaires : l'immunité à médiation cellulaire qui fait intervenir les cellules T, et l'immunité à médiation humorale qui induit la production des anticorps par les cellules B. Le CD154 est un médiateur et un régulateur central de la réponse immunitaire, son interaction avec son principal récepteur, le CD40 a été incriminée dans de nombreuses maladies inflammatoires et auto-immunes. Durant ces dernières années, la découverte de nouveaux récepteurs du CD154, tels que les intégrines α IIb β 3, α M β 2, α 5 β 1 et α v β 3, dévoile des nouveaux rôles pour cette molécule dans la médiation des réponses immunitaires. Cependant, peu de choses sont connues quant aux réponses biologiques induites par l'interaction du CD154 avec ses nouveaux récepteurs et leurs implications dans les différentes pathologies.

1.1 Le CD154

1.1.1 Structure du CD154

Le CD154, également connu sous le nom de CD40L, gp39, TRAP (TNF-related activation protein) ou encore TBAM (T-B activating molecule) [1], est une glycoprotéine transmembranaire de type 2 qui possède une extrémité C-terminale extracellulaire et une extrémité N-terminale intracellulaire. Il appartenant à la famille des facteurs de nécrose tumorale (TNF) et a été découvert en 1992 [2, 3, 4]. Le gène codant pour le CD40L est situé sur le chromosome X au niveau de la région q26.3 et q27.1. Il est divisé en 5 exons et 4 introns [5, 6]. La protéine du CD154 humain (hCD154) procède 261 acides aminés (aa) réparties sur 3 parties comme suite: la partie extracellulaire formée de 215 aa, la partie transmembranaire formée de 24 aa et la partie cytoplasmique formée de 21 aa (**Figure 1**) [5,7]. Le hCD154 procède une forte homologie (80%) avec le CD154 murin [1].

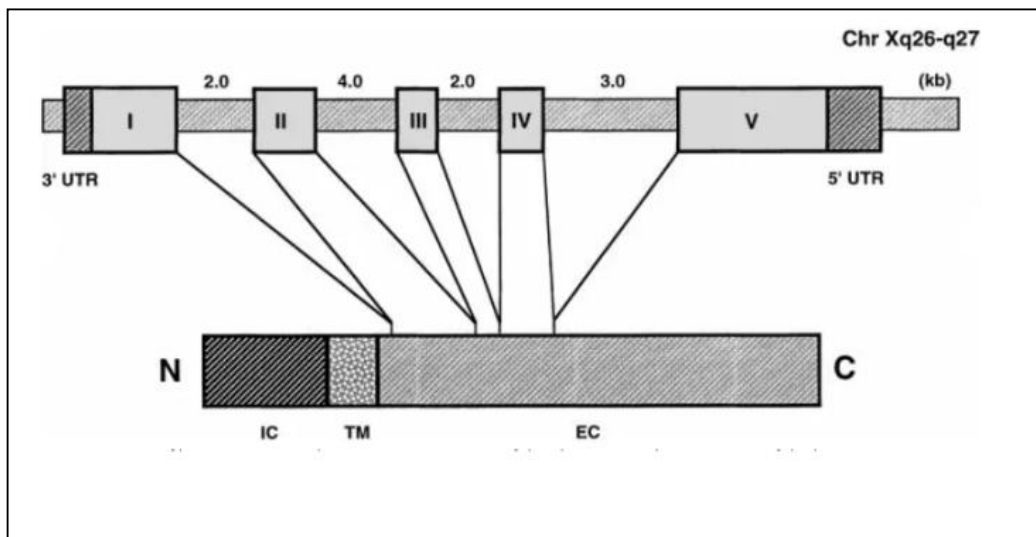


Figure 1: Structure du gène du CD154 humain. Représentation schématique de l'organisation chromosomique du gène du hCD154 situé sur le chromosome Xq26-q27. Le gène est composé de 5 exons codants pour les différentes régions de la protéine (IC= intracellulaire; TM= transmembranaire; EC=extracellulaire) [5].

Le CD154 existe sous deux formes, une forme membranaire ayant un poids moléculaire de 33-39 kDa dépendamment de la glycosylation, et une forme soluble (sCD154) 18 kDa [8]. Cette dernière résulte du clivage enzymatique de la forme membranaire par les métallo-protéinases ADAM-10 et ADAM-17 [8] entre l'acide glutamique 112 (E112) et la méthionine 113 (M113) mais peut également être due à un relargage intracellulaire [9].

Les deux formes membranaire et soluble du CD154 forment un homotrimère. Dans ce dernier, les trois molécules du CD154 sont reliées entre elles par des liaisons non covalentes [10]. La trimérisation du CD154 est primordiale pour son activité biologique [11].

1.1.2 Expression du CD154

Le CD154 a été connu pour être exprimé de façon transitoire à la surface des cellules T activées [3, 4], mais il est également exprimé à la surface de plusieurs cellules hématopoïétiques comme: les cellules dendritiques, les basophiles, les monocytes/macrophages et les plaquettes activées. Il est aussi exprimé sur certaines cellules non hématopoïétiques comme les cellules épithéliales, les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales [12, 13].

1.2 Les différents récepteurs du CD154

1.2.1 Le CD40

1.2.1.1 Structure du CD40

Le CD40 est connu pour être le principal récepteur du CD154 [3,14]. C'est une glycoprotéine transmembranaire de 45-50 kDa de type 1 dont la région carboxyterminale est intracellulaire. Le CD40 appartient à la superfamille des "tumor necrosis factor receptor" (TNF-R) [2]. Le gène codant pour le CD40 humain est situé sur le chromosome 20 entre la région q 12-et q13-2 [15]. Il est formé de 9

exons et 8 introns. La protéine du CD40 procède 277 aa qui sont répartis en 3 parties: la région intracellulaire formée de 62 aa, la région transmembranaire formée de 22 aa et la région extracellulaire formée de 193 aa. Cette dernière est riche en résidus cystéines qui permettent la formation des ponts disulfures et le repliement de la molécule du CD40 [16] (**Figure 2**). Au niveau du domaine extracellulaire, le CD40 humain et murin partage une homologie de 62%. Les 22 cystéines extracellulaires sont conservées, suggérant ainsi le même mode de repliement de la molécule du CD40 chez les deux espèces [7, 17].

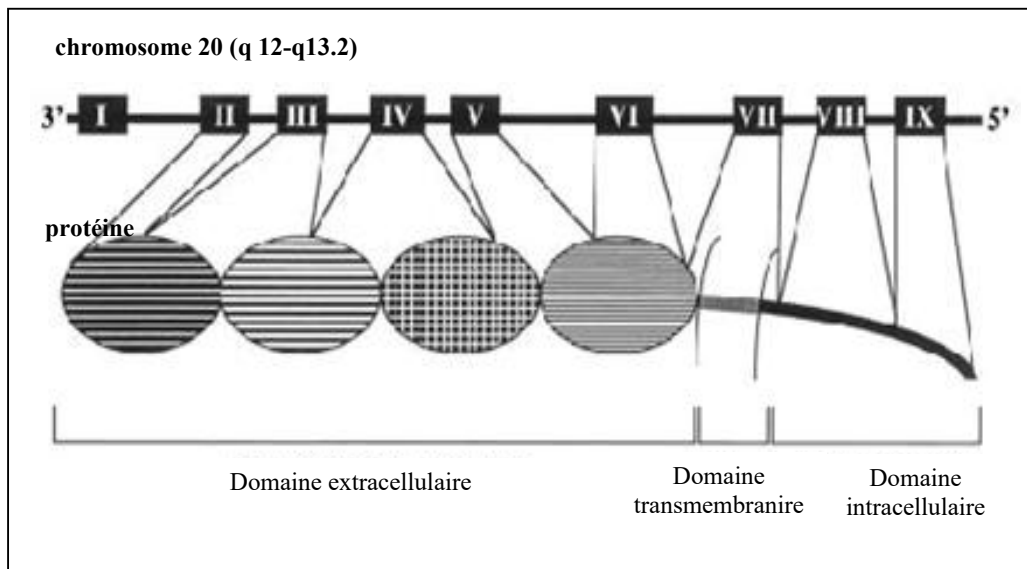


Figure 2 : Structure du gène et de la protéine du CD40 humain. Le gène du CD40 contient 9 exons codant pour les domaines extracellulaire, transmembranaire et intracellulaire de la protéine. La protéine du CD40 est principalement constituée d'un long domaine extracellulaire contenant une séquence de 20 résidus cystéines divisés en quatre domaines [5].

1.2.1.2 Expression du CD40

L'expression du CD40 a été initialement découverte à la surface des lymphocytes B, et est exprimé durant tous les stades de développement de ces dernières [7]. Comme le CD154, l'expression du CD40 est retrouvée à la surface de plusieurs

cellules hématopoïétiques et non hématopoïétiques comme les macrophages, les cellules dendritiques, les plaquettes, les basophiles, les cellules endothéliales et les fibroblastes [11, 18, 19]. Egalement, plusieurs études ont démontré que différents stimuli comme l'interféron γ (INF γ), les interleukines (IL-1 β , -2 et -4), le TNF- α et le GM-CSF (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor), les esters de phorbol, le tétradécanoylphorbol acétate (TPA) ou le phorbol myristate acétate (PMA), lipopolysaccharide (LPS), les anticorps contre l'IgM ou le CD20, peuvent réguler l'expression du CD40 à la surface des cellules [19, 20].

1.2.1.3 La signalisation induite par le CD40

Etant donné que le récepteur CD40 ne possède pas de domaine kinase qui sont nécessaires pour la signalisation cellulaire [11], il doit se lier dans son domaine intracellulaire à des protéines adaptatrices telles que les protéines TRAFs (TNFR associated factors) qui sont considérées comme les principales protéines adaptatrices impliquées dans l'induction du signal via le CD40. L'engagement du CD40 avec ses ligands, mène à l'activation de différentes protéines kinases comme les PI-3K (Phosphoinositide 3-kinases), JNK (c-Jun-NH(2)-terminal kinase), et les MAPKs (Mitogen-Activated Protein Kinase) qui dépendamment du type cellulaire, vont activer les facteurs de transcriptions comme NF κ B (nuclear factor-kappa B), CRE (cAMP response element) et AP-1 (Activator protein 1) [21], régulant ainsi plusieurs réponses biologiques telles que la commutation isotypique, la prolifération, la survie et l'apoptose [22, 12, 23]. Il a été démontré que sur certaines cellules, le CD40 peut induire une signalisation indépendante des TRAFs impliquant les JAKs et les membres de la famille des STATs (Signal Transducer and Activator of Transcription) (**figure 3**) [24, 25].

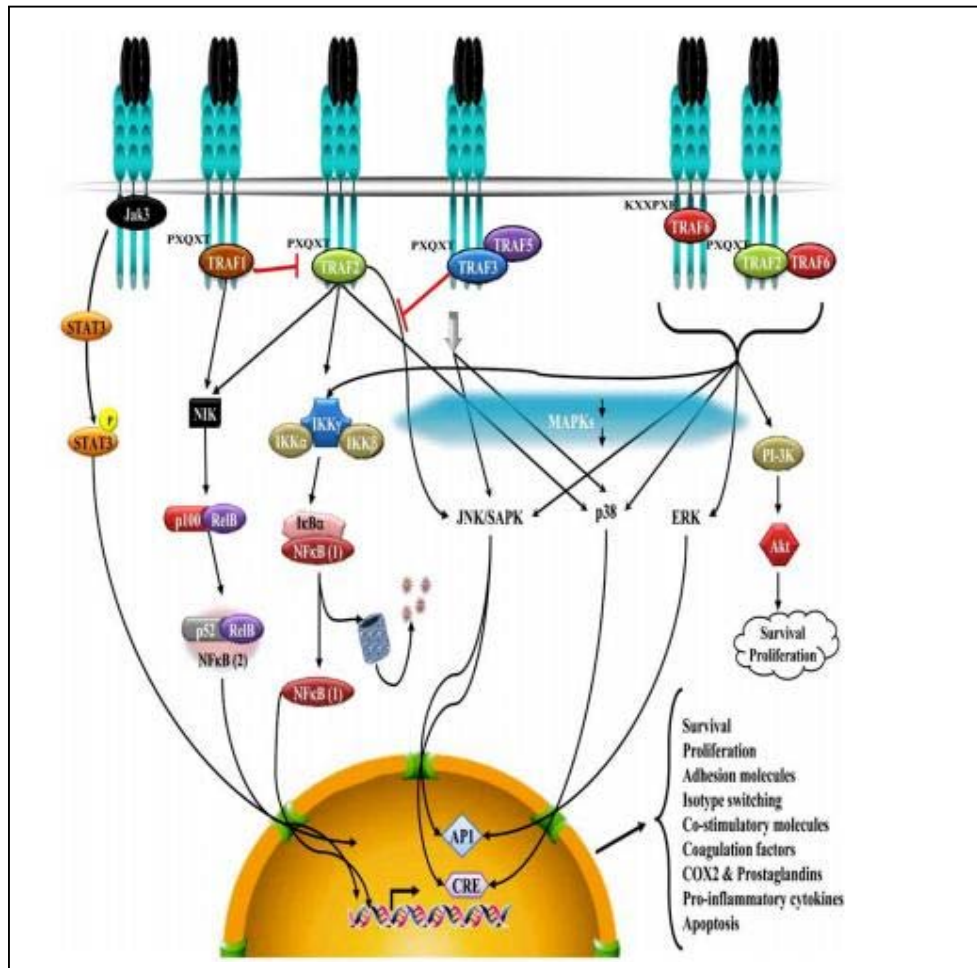


Figure 3: Signalisation induite par le CD40 suite à son association aux différentes protéines adaptatrices TRAFs et Jak 3. Lors de l'oligomérisation du CD40 avec le CD154, les protéines adaptatrices TRAF sont recrutées au niveau de leur site de liaison respectif sur le récepteur CD40. Le CD40 a deux sites de liaison différents pour les TRAF. TRAF1, -2 et -3 se lient au site distal de la queue cytoplasmique du CD40 tandis que TRAF6 se lie au site proximal de la queue cytoplasmique. TRAF5 peuvent former des hétéro-oligomères avec TRAF3 et TRAF6 à TRAF2. Le CD40 peut également interagir avec un autre adaptateur de protéine, JAK3 de façon indépendante des TRAFs et induire différentes réponses biologiques [25].

1.2.1.4 Interaction du CD40 avec le CD154

Il a été démontré que les deux formes du CD154 membranaire et soluble (sous leur forme trimérique) peuvent interagir avec le CD40. Cette liaison s'effectue au niveau des résidus tyrosine 145 (Y154) et arginine 203 (R203) du CD154.

La structure précise par laquelle CD40 se trouve sur la surface de la cellule est encore sujette à controverse. Jusqu'à maintenant, deux modèles d'interactions possibles entre le CD154 et le CD40 ont été décrits. Le CD40 est soit un trimère préassemblé constitutivement associées au niveau de la membrane, ou il existe sous forme de dimère qui est trimérisé lors de la ligature de CD154. En effet, dans le premier modèle, nous avons montré que lors de la liaison du CD154 trimérique, le CD40 peut oligomériser en dimères entre les résidus de cystéine 238 situés dans la région intracellulaire du CD40 [26, 27]. Par la suite, le CD40 s'associe aux TRAF pour induire différentes voies de signalisation. Cependant, il n'a pas été déterminé si cette association est entreprise avant ou après la liaison disulfure. Cette dimérisation apparaît essentielle pour l'activation de la phosphoinositide-3 kinase (PI-3K) et l'activation ultérieure de B7.2, ainsi que pour la production d'IL-8 dans les cellules B (**voir figure 4**) [25].

Par ailleurs, dans le deuxième modèle d'interaction, on décrit le CD40 sous forme trimérique à la surface membranaire augmentant ainsi son affinité pour le CD154 lui aussi sous forme trimérique. Une étude en faveur de cette hypothèse a démontré que tous les récepteurs associés à la famille du TNF, incluant le CD40 se retrouvent sous forme de trimères préassemblés au niveau de la membrane plasmique [25]. Cependant, des études supplémentaires sont nécessaires pour clarifier davantage la structure exacte du CD40 à la surface de la cellule.

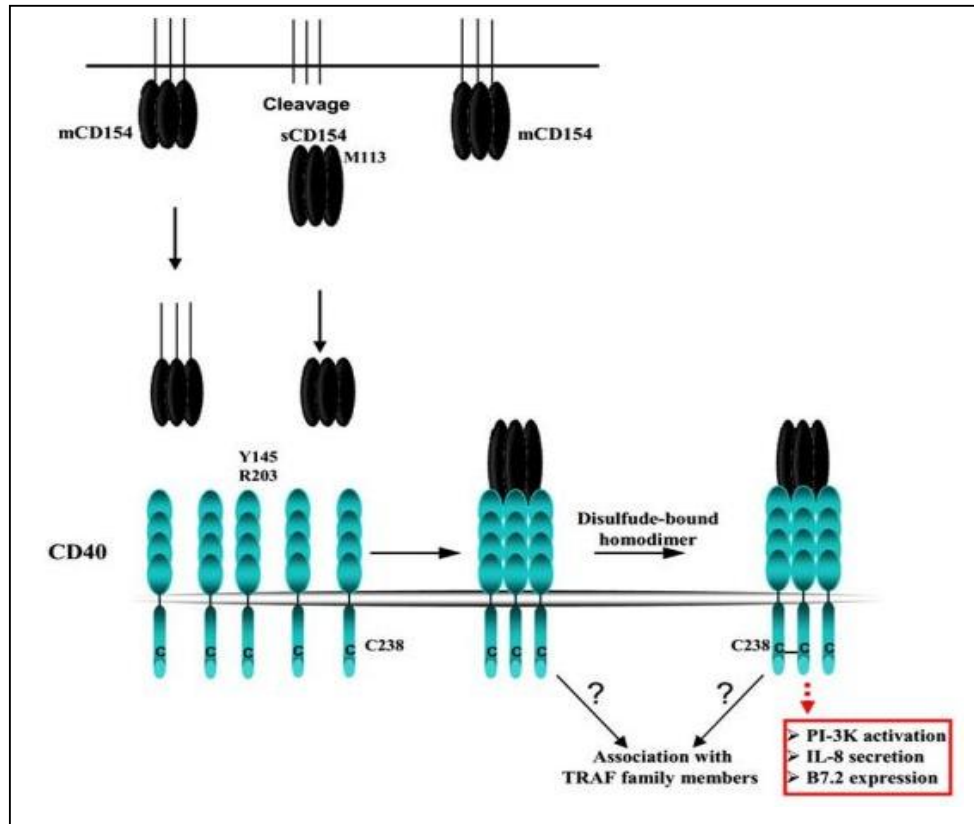


Figure 4: Interaction CD40/CD154. Le sCD154 est libéré de la surface cellulaire au niveau du résidu M113. Les deux formes du CD154 membranaire et soluble sous leur forme trimérique interagissent avec le CD40 via leurs résidus R203 et Y145 facilitant ainsi la trimérisation du récepteur. Cette interaction induit la formation d'oligomère CD40, qui est médiée par des liaisons disulfure (S-S) entre la cystéine en position 238 dans le domaine intracellulaire du CD40. CD40 s'associerait avec des membres de la famille TRAF. La dimérisation du CD40 est nécessaire pour la régulation de la phosphoinositide-3 kinase (PI-3K), l'expression de B7.2 et l'IL-8 dans les cellules B [25].

1.2.1.5 Rôle de l'interaction CD40/CD154 dans les fonctions cellulaires

L'interaction CD40/CD154 joue un rôle très important dans la réponse immunitaire. Au niveau des lymphocytes B, l'interaction du CD40 des lymphocytes B avec le CD154 des lymphocytes T activés est cruciale à la réponse immunitaire humorale.

En effet, en présence de cytokines relâchées par les lymphocytes T (IL-4, IL-2 et IL-10), elle induit la prolifération et la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes en favorisant la production des immunoglobulines IgA et IgG [28]. Chez les patients atteints du syndrome d'hyper IgM, l'absence d'interaction CD40/CD154 due à des mutations au niveau du gène codant pour le CD154 ou niveau de celui codant pour le CD40, induit chez ces patients des concentrations élevées des IgM et un niveau très faible des IgG et des IgE dues à l'incapacité des lymphocytes B à induire la commutation isotypique (**figure 5**) [29, 30, 31].

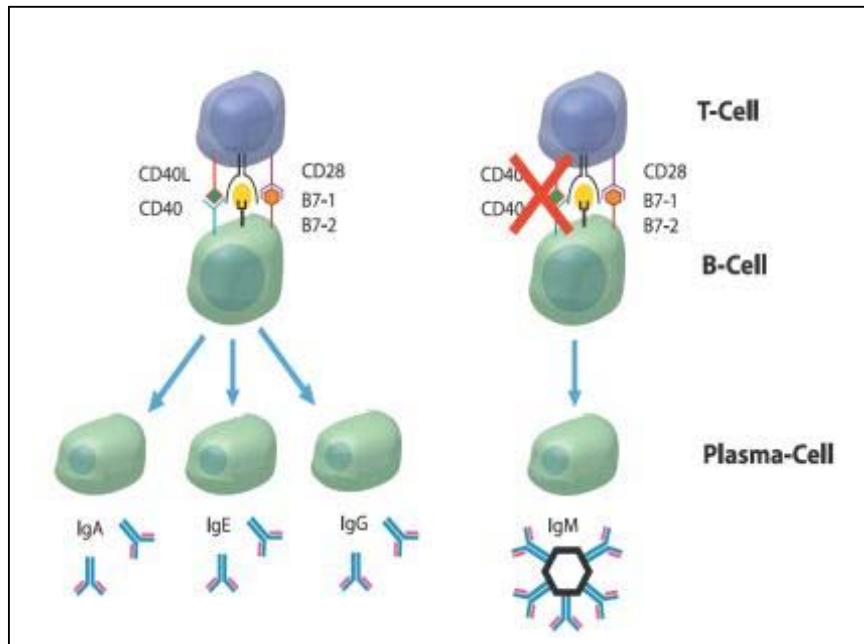


Figure 5: Rôle de l'interaction CD40/CD154 dans la production d'anticorps par les lymphocytes B lors de la réponse immunitaire. La commutation des isotypes de la chaîne lourde Ig est initiée par l'interaction CD40/CD154. En l'absence de CD40 ou de CD4154, les cellules B ne sécrètent que des IgM et ne parviennent à induire la commutation isotypique [31].

Lorsqu'il est exprimé à la surface des lymphocytes B, le CD154 peut interagir avec le CD40 d'une autre cellule B, formant une boucle de rétroaction positive qui permet l'activation et la génération de cellules B mémoires [32, 33, 34, 35]. De plus, au niveau des lymphocytes B, l'interaction CD40/CD154 induit la production des

cytokines IL-6, IL-10 et TNF- α , l'augmentation de l'expression de la molécule ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule 1), LFA-1 (Lymphocyte function-associated antigen 1), VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1), ainsi que les protéines de CMH-I (major histocompatibility complex-I) et CMH-II (major histocompatibility complex-II) facilitant ainsi la prolifération et la différenciation de ces cellules en cellules plasmiques [28]. Au niveau des lymphocytes T CD4⁺, l'interaction CD40/CD154 avec les molécules de costimulation (complexe CD28/B7) est primordiale et constitue le deuxième signal requis à la prolifération, la différenciation et la survie des cellules T [36, 37]. Une fois activées, ces cellules expriment le CD154 à leur surface. Ce dernier interagit avec le CD40 exprimé à la surface des cellules présentatrices d'antigènes (APCs : antigen-presenting cell) comme les cellules dendritiques et va permettre la prolifération des lymphocytes T et leur différenciation en cellules T effectrices [37]. Au niveau des lymphocytes T CD8⁺, la signalisation CD40/CD154 est essentielle pour une réponse T cytotoxique efficace. En effet, il a été démontré que les lymphocytes T CD8⁺ activés peuvent également comme les APCs exprimer le CD40. Ce dernier est capable d'interagir avec le CD154 des lymphocytes T CD4⁺ activés, induisant la survie des lymphocytes T CD8⁺ et leur différenciation en cellules mémoires capables d'exercer leurs fonctions cytotoxiques notamment sur des cellules cancéreuses métastatiques [38, 39, 40]. Au niveau des cellules dendritiques, l'axe CD40/CD154 participe à l'interaction de ces dernières avec les lymphocytes B. Cette interaction induit la sécrétion de la protéine BAFF (B-cell activating factor) et APRIL (a proliferation-inducing ligand) à la surface des cellules dendritiques favorisant ainsi la différenciation des lymphocytes B en cellules plasmiques productrices d'immunoglobulines en présence IL-2 et IL-4 [42].

De plus, lors d'une réponse immunitaire, l'activation des cellules dendritiques induit une augmentation significative du CD40 membranaire à leur surface. Ce dernier va interagir avec le CD154 des lymphocytes T activés augmentant l'expression des molécules co-stimulatrices CD80/CD86 et la sécrétion des cytokines IL-12 et IL-10 par les cellules dendritiques, ce qui va induire la polarisation des lymphocytes T en Th1 (**figure 6**) [43, 44, 45, 46, 47].

Il a été démontré par Duffau et al., que chez les patients atteints du lupus, l'activation plaquettaire était corrélée à la sévérité de la maladie [48]. Les plaquettes des patients formaient des agrégats avec les cellules présentatrices d'antigène, comme les monocytes et les cellules dendritiques plasmacytoïdes et étaient capable d'augmenter la sécrétion de l'IFN- α par les cellules dendritiques suite à une interaction CD40/CD154 in vitro [48].

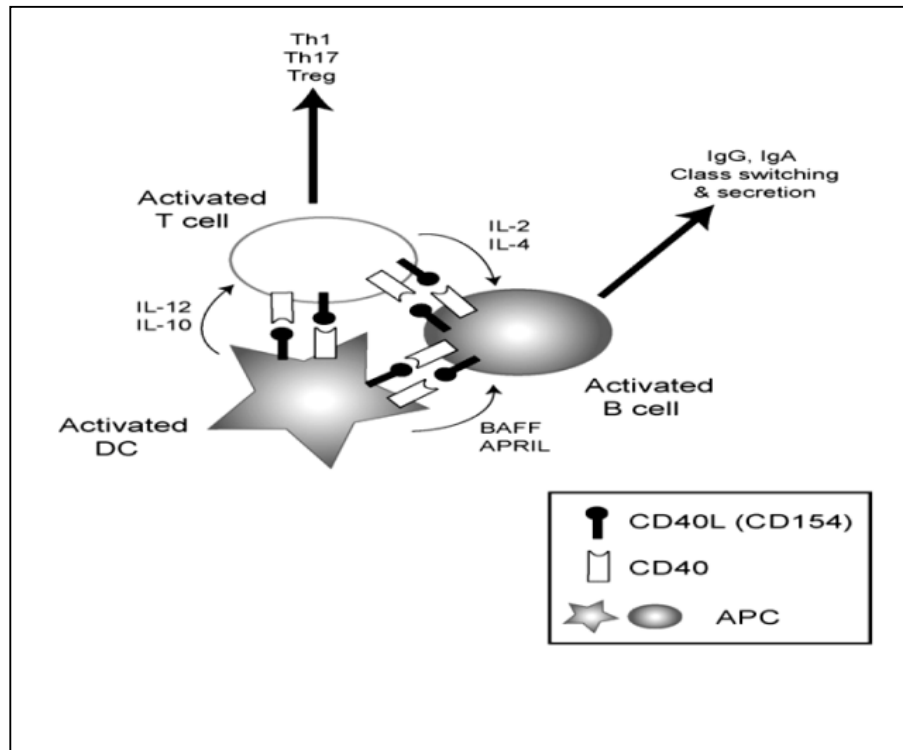


Figure 6: Rôle de l'interaction CD40/CD154 au niveau des cellules dendritiques. Le CD40 et CD154 sont tous deux exprimés sur des CD et des lymphocytes activés. La signalisation CD40 sur les CD induit la sécrétion de différentes cytokines qui favorisent la polarisation en Th1, Tregs ou Th17. La signalisation par le CD40 induit également la sécrétion de BAFF et APRIL, qui en présence de l'IL-2 et l'IL-4 provenant des lymphocytes T, induisent la sécrétion et la commutation de classe vers IgG et IgA [47].

Au niveau des macrophages, l'interaction CD40/CD154 augmente l'expression des molécules de costimulation B7.1 et B7.2, ICAM-1 et LFA-3, ainsi que la sécrétion des différentes cytokines comme l'IL-12, l'IL-1, l'IL-6, l'IL-8, le TNF α et le relâchement des MMPs (métalloprotéines) comme les MMP-1, 2, 3 et 9 [49, 50, 51, 52]. Les monocytes expriment constitutivement le CD40 qui interagit avec le CD154 des lymphocytes T. Cette interaction induit l'activation et la différenciation des monocytes en macrophages et permet l'activation des lymphocytes T [53, 54]. Au niveau des plaquettes, le CD40 est exprimé de façon constitutive alors que l'expression du CD154 nécessite l'activation de ces dernières. Il a été démontré que l'interaction du CD40 plaquettaire avec le CD154 des cellules endothéliales augmente l'expression des molécules d'adhésion ICAM-1, VCAM-1 et E-sélectine ainsi que la production des cytokines et des chimiokines MCP1 (monocyte chemoattractant protein-1), l'IL-6, l'IL-8, et induit la production de la MMP-9 augmentant ainsi la réponse inflammatoire au niveau de ces cellules [55]. Au niveau des cellules musculaires lisses, l'interaction CD40/CD154 induit leur prolifération ainsi que leur migration [56, 57]. Au niveau des cellules endothéliales, cette interaction induit la sécrétion de plusieurs cytokines comme l'IL-1, l'IL-6, l'IL-8, MCP-1, MIP-1 α (Macrophage inflammatory protein-1 alpha) et RANTES (Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted), favorisant ainsi le recrutement des cellules immunitaires au niveau du site d'inflammation [58, 59].

1.2.2 Les intégrines α IIb β 3, α M β 2, α v β 3 et α 5 β 1

Depuis plusieurs années, le CD40 était considéré comme étant le seul récepteur du CD154 [3]. Cependant, de nouveaux travaux ont démontré que le CD154 pouvait également lier d'autres récepteurs membres de la famille des intégrines, dont : l' α IIb β 3 [60], l' α 5 β 1 [61], α M β 2 [62] et α v β 3 [63].

1.2.2.1 Les intégrines

Les intégrines sont des récepteurs d'adhérence cellulaire qui contrôlent les interactions cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire (MEC). Elles ont été découvertes dans les années 1980. Les intégrines tiennent leur nom du fait qu'elles

constituent le lien principal entre les signaux intra- et extracellulaires et ont un rôle important dans la coordination entre le cytosquelette et la matrice extracellulaire (MEC) [64]. En effet, les intégrines contrôlent de nombreux processus cellulaires tels que l'adhérence, la migration, la prolifération, la différenciation et l'apoptose. Etant donné leurs rôles importants, elles ont été incriminées dans de nombreuses pathologies et sont la cible de nombreuses thérapies [65, 66, 67, 68].

1.2.2.1.1 Structure des intégrines

Les intégrines sont des récepteurs transmembranaires hétérodimériques composées de deux sous-unités α et β qui sont associées de manière non covalente. Chez l'homme, on compte 18 sous-unités α et 8 sous-unités β qui s'associent pour former 24 hétérodimères différents. En fonction de leur spécificité de ligand, les intégrines peuvent être classées en quatre grands groupes : les intégrines liant la laminine, les intégrines liant le collagène, les intégrines reconnaissant les motifs RGD et les intégrines leucocytaires (**figure 7**) [69, 70, 71, 72, 73].

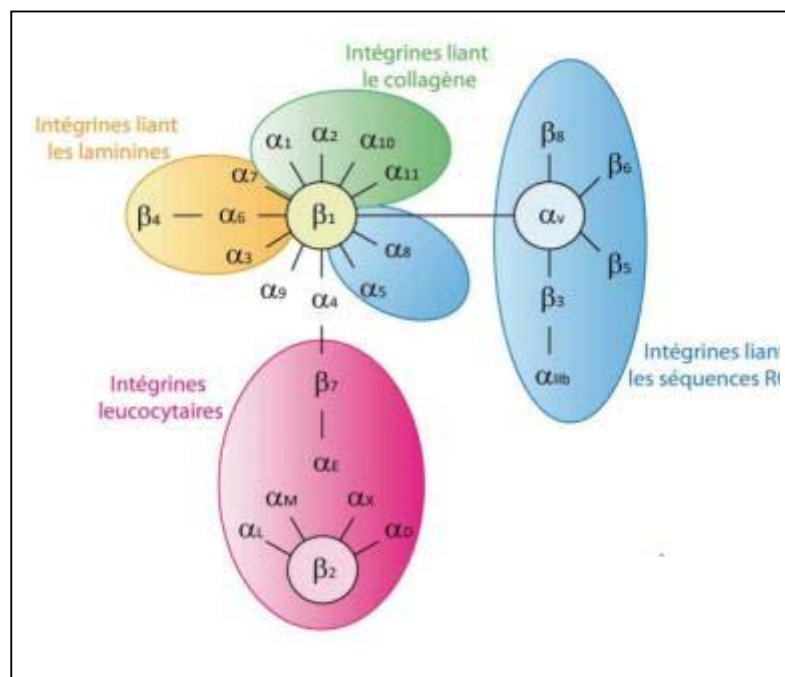


Figure 7: Les récepteurs de la famille des intégrines. Les intégrines sont constituées de 24 hétérodimères différents et sont classées en 4 sous-groupes, en fonction du type de ligand reconnu [73].

Les intégrines sont formées de trois domaines : un long domaine extracellulaire de 700 à 1100 aa, qui est responsable de la reconnaissance et de la liaison du ligand aux deux sous unités α et β de l'intégrine [65, 74, 75, 76].

La sous unité α du domaine extracellulaire compte une hélice de 7 segments composés d'environ 60 aa. Chaque segment est formé de feuillets β et participe à la formation de la tête de l'intégrine. Les derniers segments possèdent des sites de liaison au calcium (Ca^{2+}), au magnésium (Mg^{2+}) et au manganèse (Mn^{2+}) [77]. On trouve également au sommet de la sous unité α le domaine αI , ou domaine A, qui est responsable de la reconnaissance du ligand par les intégrines possédant ce domaine. Le reste de la sous-unité α est formé d'une région linéaire constituée de trois feuillets β [78, 65, 74, 75, 76].

Quant à la sous unité β du domaine extracellulaire, elle est composée d'un domaine PSI (plexine/sémaphorine/intégrine) dans sa région N-terminale, d'un domaine hybride, dans lequel s'insère un domaine βI , qui participe à la reconnaissance du ligand pour les intégrines ne possédant pas le domaine αI , de 4 domaines « EGF-like » (I-EGF1 à 4) et d'une queue β (**figure 8**) [79, 80, 81, 82]. Le domaine transmembranaire des intégrines est très court, il compte entre 20 à 30 aa et est en forme d'hélice. Le domaine cytoplasmique quant à lui compte entre 10 à 75 aa. [80], sauf pour l'intégrine $\beta 4$ qui compte plus de 1000aa et il est dépourvu de toute activité enzymatique. Il joue un rôle très important dans la liaison avec de nombreuses protéines intracellulaires comme la taline et les kindlines ainsi que dans les fonctions intracellulaires des intégrines grâce aux deux motifs NPXY/Fet NXXY/F de la sous unité β [81].

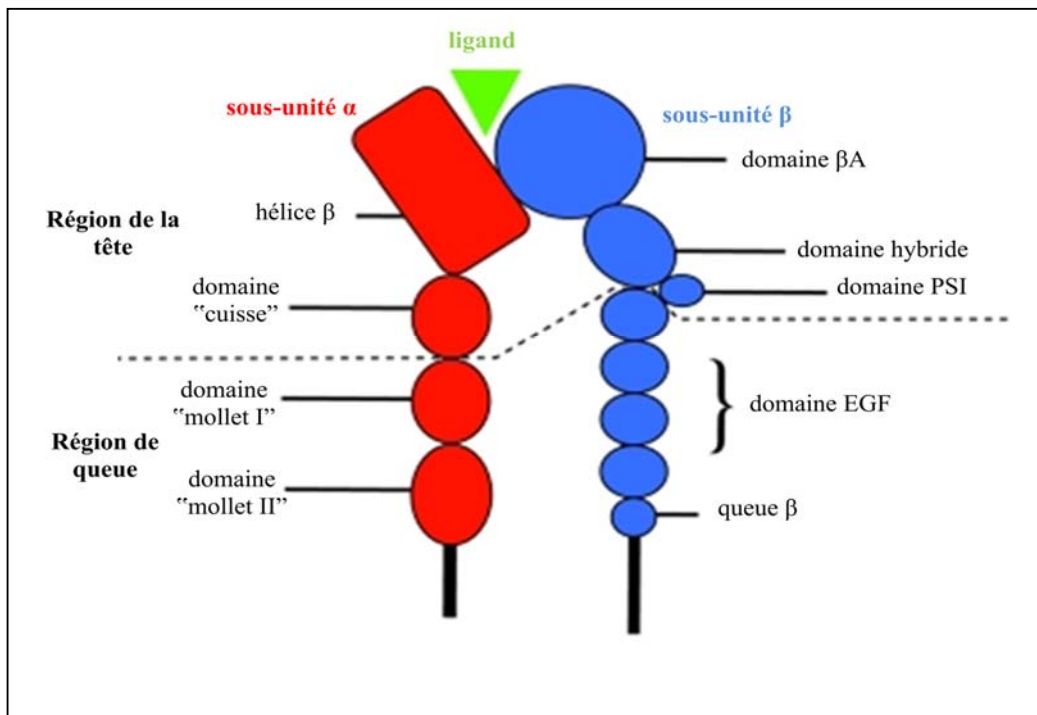


Figure 8: Structure cristallographique d'une intégrine. Les intégrines sont formées de trois domaines : un long domaine extracellulaire, qui est responsable de la reconnaissance et de la liaison du ligand aux deux sous unités α et β de l'intégrine, d'un très court domaine transmembranaire et d'un domaine cytoplasmique [82].

1.2.2.1.2 Les intégrines et leurs ligands

La liaison des intégrines avec leurs ligands est primordiale pour la transmission du signal et l'activation des différentes voies de signalisation à l'intérieur de la cellule. Les constituants de la matrice extra cellulaire tels que le collagène, la fibronectine ou la laminine, constituent les principaux ligands des intégrines. Les intégrines $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 10\beta 1$ et $\alpha 11\beta 1$ sont les principaux récepteurs du collagène, les intégrines $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$ et $\alpha 7\beta 1$ sont ceux de la laminine et les intégrines $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 8\beta 1$, $\alpha 11\beta 3$ et $\alpha v\beta 3$ sont les récepteurs majeurs de la fibronectine [83]. En plus des constituants de la MEC, les intégrines peuvent interagir avec les VCAM-1, les

ICAM et les cadhérines qui sont des récepteurs présents à la surface des cellules voisines [65, 74, 75, 76].

1.2.2.1.3 Activation des intégrines

L'interaction des intégrines avec leurs ligands induit un changement de conformation de ces dernières qui peuvent adopter trois différentes conformations: inactive, partiellement active et active (**figure 9**) [76, 82, 84]. La conformation inactive est une conformation fermée ou repliée de l'intégrine, dans laquelle elle a une faible affinité pour son ligand. Ici, les domaines transmembranaire et cytoplasmique des sous unités α et β sont bloqués par des ponts salins qui empêchent la liaison de l'intégrine avec les protéines intracellulaires. L'interaction de l'intégrine avec des partenaires intracellulaires tels que la taline ou la kindline au niveau du domaine cytoplasmique de la sous-unité β , permet la rupture des ponts salins, la séparation des deux sous unités dans leur région cytoplasmique puis transmembranaires induit un changement dans la conformation modifiant ainsi l'affinité de l'intégrine à son ligand. Cette signalisation est appelée « inside-out ». Le changement de conformation induit par cette signalisation permet la liaison du ligand à l'extérieur de la cellule qui régulera alors la transmission des signaux intracellulaires induisant ainsi une signalisation « outside-in » [65, 85, 86, 87, 88]. Cette dernière, permet le maintien de l'intégrine en conformation active et le regroupement de plusieurs intégrines à de nombreux partenaires cytoplasmiques pour former des complexes multiprotéiques, qui permet la régulation de nombreux processus intracellulaires. La signalisation inside-out et outside-in sont des processus liés qui confèrent à l'intégrine le potentiel d'induire une signalisation bidirectionnelle (**Figure 9**) [69, 71, 76].

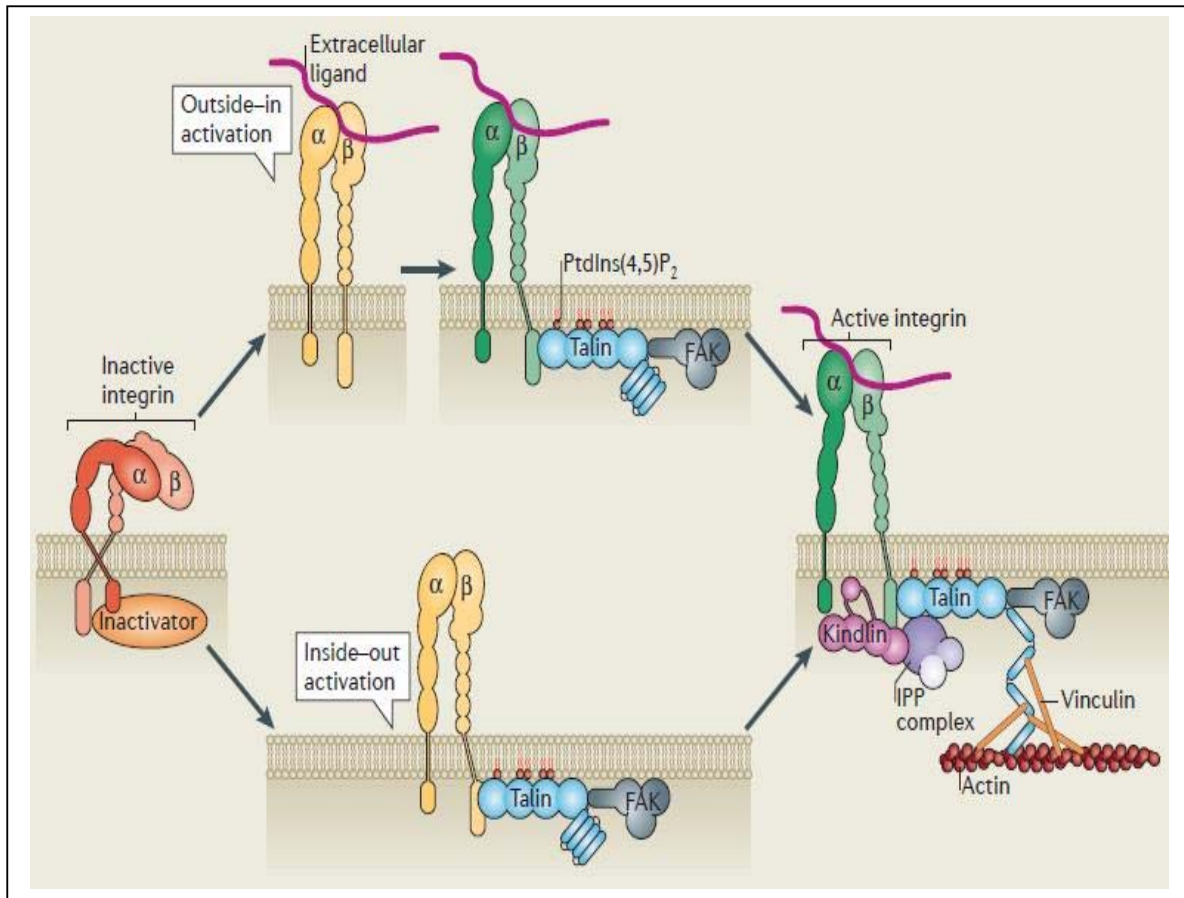


Figure 9 : Activation des intégrines. L'activation Inside-out dépend de la liaison des protéines intracellulaires aux domaines cytoplasmiques de l'intégrine. La talin et FAK sont parmi les premières protéines à être recrutées. Pour l'activation outside-in, la liaison du ligand induit une transition d'une conformation «fermée» à une conformation «ouverte» du domaine I de la sous-unité β [76].

1.2.2.1.4 Régulation de l'activation des intégrines

1.2.2.1.4.1 Régulation par les cations divalents et les ligands

L'activation des intégrines peut être modulée par des cations divalents. Des études effectuées sur l'interaction de l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ et son ligand la fibronectine a démontré les différents effets des cations comme le Mg^{2+} , le Mn^{2+} et le Ca^{2+} sur

l'activation des intégrines [89]. Alors que le Mg^{2+} et le manganèse Mn^{2+} favorisent la liaison du ligand sur les intégrines, le Ca^{2+} a un effet inhibiteur et empêche la liaison avec le ligand [77]. L'activation des intégrines est également modulée suite à leur interaction avec des petits peptides tels que les RGD ou des anticorps activateurs dits LIBS (Ligand Induced Binding Site) qui induisent le changement de conformation des intégrines [90, 91, 92].

1.2.2.1.4.2 Les régulateurs d'activation des intégrines

1.2.2.1.4.2.1 Les régulateurs positifs : Taline et Kindline

La taline et les kindlines sont nécessaires pour la rupture des ponts salins qui relient les deux sous unités α et β des intégrines. La liaison de ces dernières au niveau du domaine cytoplasmique de l'intégrine permet leur activation. La taline se trouve dans un état inactif où son domaine FERM (Four-point-one protein, Ezrin, Radixin, Moesin) est masqué. La protéolyse par la calpaine ou la liaison de PI4,5P2 (Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate) induisent l'activation de la taline [93, 94]. Une fois activée, la taline se lie par son domaine phosphotyrosine binding (PTB) au motif membranaire proximal NPxY. Cette interaction permet de fournir un point d'ancrage solide entre la taline et l'intégrine mais ne permet pas la rupture des ponts salins et la dissociation des sous unités α et β de l'intégrine, car cette dernière reste dans un état de faible affinité pour son ligand. La liaison du domaine FERM de la taline à un second site de la région membranaire proximale induit la rupture des ponts salins et le changement conformationnel de l'intégrine qui permettra à cette dernière d'avoir une forte affinité pour son ligand extracellulaire [95].

Les kindlines jouent un rôle important dans l'activation de la taline mais n'activent pas directement les intégrines. Elles ont dans leur partie C-terminale un domaine FERM qui contient un motif PTB-like proche de celui de la taline. Ce domaine permet l'interaction avec les intégrines $\beta 1$, $\beta 2$ et $\beta 3$ [96]. Les kindlines interagissent via leur domaine PTB-like avec le motif NxxY distal des intégrines. Toutefois, une

séquence S/T-T située en amont du NxxY est également nécessaire à l'interaction de l'intégrine et la kindline. La fixation de la kindline sur l'intégrine aurait un effet synergique sur l'activation de cette dernière par la taline. Le mode d'action exact de la kindline n'est pas encore tout à fait élucidé. Toutefois, il semblerait que la kindline en se fixant sur la sous-unité β réduirait la flexibilité de sa queue cytoplasmique, permettant ainsi une interaction optimale avec la taline.

1.2.2.1.4.2.2 Les régulateurs négatifs

Il existe plusieurs molécules qui rentrent en compétition avec la taline et empêchent l'activation des intégrines. Parmi ces dernières on peut citer la protéine Dok1 (docking protein 1) qui, en se fixant sur la sous unité $\beta 3$ empêche la liaison de la taline à l'intégrine [97]. La protéine ICAP-1 (Integrin Cytoplasmic domain Associated Protein-1) régule négativement l'activation des intégrines en se fixant sous-unité $\beta 1$ [98, 99]. La protéine régulatrice SHARPIN (SHANK-associated RH domain interactor) quant à elle se fixe au domaine cytoplasmique de la sous unité α de l'intégrine et bloque la fixation de la taline sur cette dernière [100].

1.2.2.1.4.3 Plateforme de signalisation des intégrines

Lors de l'adhérence à la MEC, les intégrines interagissent avec des protéines du cytosquelette comme la taline et la vinculine et forment des réseaux de filaments d'actine. Ces derniers se réorganisent et déclenchent une boucle de rétrocontrôle positive. Elles provoquent ainsi l'agrégation des intégrines au niveau de la membrane cytoplasmique formant des complexes multi-protéiques appelés plaques d'adhérence focales. Ces dernières constituent un réseau de 156 protéines et mettent en évidence le rôle primordial que jouent les intégrines au niveau de la signalisation intracellulaire (**tableau 1**) [101]. On y trouve : 24 protéines du cytosquelette, 9 protéines se liant à l'actine, 10 protéines sérine/thréonine kinases, 3 protéines sérine/thréonine phosphatases, 9 protéines tyrosine kinases, 8 GAP, 8 GEF, 7 récepteurs transmembranaires, 6 protéines d'adhérence, 5 GTPases et 32 autres

protéines. L'assemblage de ces protéines joue un rôle majeur de la transmission de signaux contrôlant divers processus cellulaires [102]. FAK (focal adhesion kinase) est une protéine particulièrement importante dans la transmission du signal induit par les intégrines. L'agrégation des intégrines induit l'activation de FAK au sein des adhésions focales. FAK constitue l'un des points centraux les plus importants de ces connexions grâce à sa localisation préférentielle près des intégrines, au niveau des complexes d'adhérence. Elle interagit avec plusieurs protéines adaptatrices comme la paxilline et la Grb2, et recrute plusieurs protéines de signalisation contenant des domaines SH2. FAK a été impliquée dans l'activation des voies de signalisation PI3-k/AKT et Ras/MAP-kinas qui contrôlent notamment plusieurs processus cellulaires comme la migration et la survie [103, 104, 105, 106, 107, 108].

	INTERACTIONS	ACTIONS
FAK	Intégrines, récepteurs de facteurs de croissance, Src, Fyn, PI3-kinase, Grb2, Grb7, PLC-g, p130 ^{Cas} , Graf, ASAP1, paxilline, taline, PTEN, Nck	Activation directe ou indirecte de nombreuses protéines du complexe d'adhérence aboutissant à l'activation de plusieurs voies intracellulaires réglant le cycle, la survie et la migration cellulaires. Pourrait participer aux processus de cancérogenèse
Src	FAK et paxilline, récepteurs de facteurs de croissance	Phosphorylation de plusieurs protéines du complexe d'adhérence permettant leur activation
Grb2	FAK, SOS et Ras	Activation de la voie des Erk/MAPK aboutissant à la régulation de gènes, à l'activation du cycle cellulaire. Rôle anti-apoptotique. Potentialise l'activation de Erk par les récepteurs de facteurs de croissance
p130^{Cas}	FAK, Nck et Crk	Activation de la voie de JNK, de Erk/MAPK, régulation du cycle et de la migration cellulaires. Rôle anti-apoptotique.
PI3-kinase	FAK, Akt, phospho-inositides membranaires	Kinase spécifique du phosphatidyl inositol. Rôle dans la survie cellulaire par le biais de NFk B. PLC-g, FAK, DAG et phospholipides. Hydrolyse les phospholipides tels que PIP ₂ . Activation de PKC et mobilisation du calcium intracellulaire aboutissant au remaniement du cytosquelette et à l'activation de facteurs de transcription
Grb7	Différents RTK comme Erb2, Erb3, FAK, PI3-kinase et les phospho-inositides membranaires	Remaniement du cytosquelette. Interagit avec FAK, PI3-kinase et les phospholipides membranaires au cours de la migration.
Graf	Liaison à Rho	Inhibe Rho. Régulation du remaniement du cytosquelette avec diminution de l'adhérence cellulaire
Paxilline	Taline, Crk, C-Src, PKL, PAK, vinculine, Pyk2	Participe à la cohésion des complexes d'adhérence, à l'activation de Erk
Taline	Domaine cytoplasmique de la sous-unité b des intégrines, actine, FAK, layiline, vinculine.	Participe à l'assemblage du complexe d'adhérence et au déroulement correct de la migration. Mécanisme partiellement élucidé

Tableau I: Les principaux intervenants du complexe d'adhérence. Le complexe d'adhérence est une large structure composée de protéines. Au sein de ces complexes, FAK est l'un des points centraux de ces connexions en étant l'intermédiaire entre les signaux activateurs des intégrines ou des facteurs de croissance et les autres protéines. Le nombre de protéines nécessite l'association de plusieurs protéines FAK pour permettre une bonne cohésion du système [101].

1.2.2.1.4.4 Régulation des fonctions cellulaires par les intégrines

Les intégrines sont des acteurs clés dans la transduction des signaux provenant de la MEC. Elles jouent un rôle primordial dans la régulation de nombreuses fonctions cellulaires comme la migration, la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire (**figure 10**).

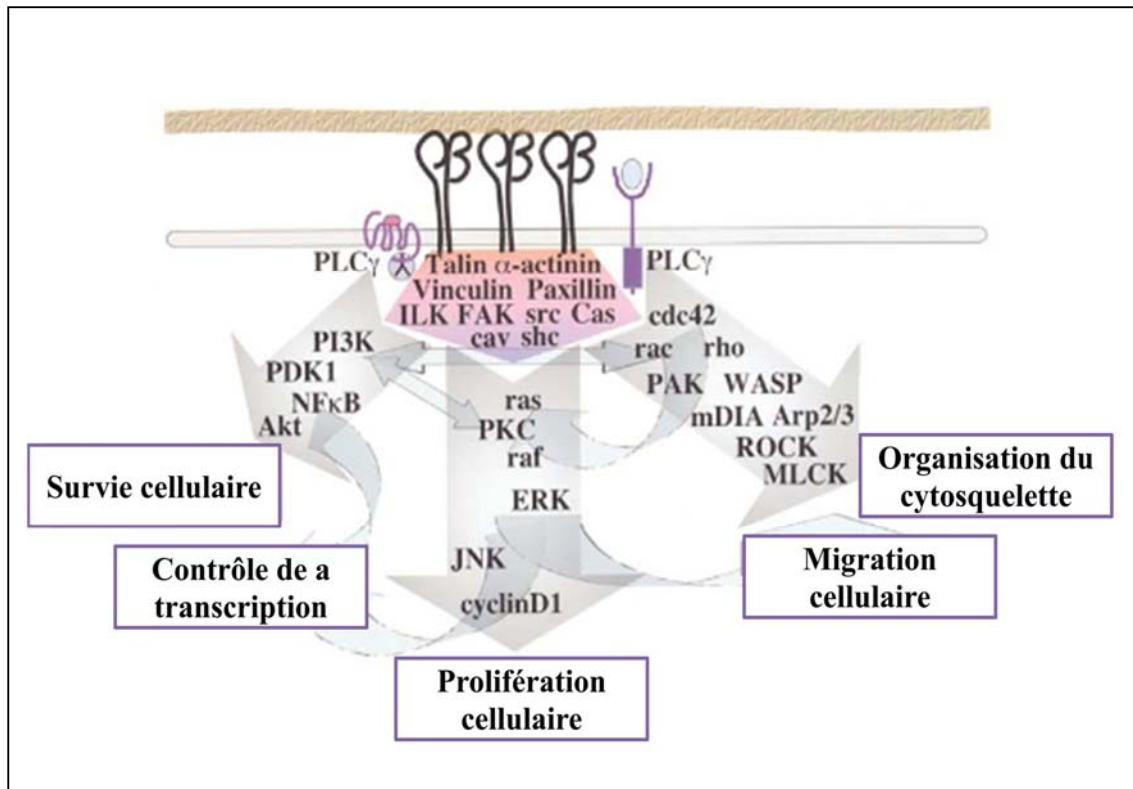


Figure 10 : Régulation des fonctions cellulaires par les intégrines. Les intégrines peuvent activer différentes voies de signalisation permettant le contrôle de fonctions cellulaires essentielles telles que la survie, la prolifération et l'invasion [65].

1.2.2.1.4.4.1 Adhérence et migration cellulaire

L'adhérence et la migration cellulaires jouent un rôle essentiel dans de très nombreux processus physiologiques notamment au cours de la réponse immunitaire dans le recrutement de cellules spécialisées au site d'infection.

La migration est un processus qui fait intervenir plusieurs étapes, parmi elle, l'adhérence à la matrice extracellulaire qui permet l'étalement de la cellule et la formation au front de migration de sites d'adhérences focales qui stabilisent les protrusions membranaires de type lamellipodes et filopodes et permettent ainsi le déplacement de la cellule. Les intégrines jouent un rôle majeur dans ce processus et servent de point d'ancrage reliant la matrice extracellulaire au cytosquelette d'actine. Ces dernières recrutent de nombreuses protéines cytoplasmiques et forment des adhésions focales.

Les sites d'adhérences focales sont constitués d'un assemblage d'intégrines, regroupées en amas et reliées aux fibres du cytosquelette par des protéines d'ancrage telles que: la vinculine, la paxiline, l'alpha-actinine, la taline et la tensine. Le complexe d'adhérence focale est composé d'une centaine de protéines qui interagissent avec d'autres protéines du cytosquelette pour réguler l'activation de plusieurs voies de signalisation dont les GTPases de la famille Rho (Rho, Rac et Cdc42) [109]. Ces dernières sont impliquées dans la polymérisation de l'actine. Ils opèrent dans des voies de signalisation distinctes pour l'organisation du cytosquelette d'actine. Rho est impliquée dans la formation des zones d'adhérences focales et des fibres de tension. Elle active ROCK (Rho kinase) qui va phosphoryler la phosphatase MLCP (myosin light-chain phosphatase) et la MLCK (Myosin Light Chain Kinase), permettant ainsi la phosphorylation de la MLC. Rac et Cdc42 quant à elles, sont impliquées dans la dépolymérisation de l'actine par l'activation de PAK (p21 activated kinase) qui phosphoryle directement MLCK [110, 111, 112, 113, 114, 115].

1.2.2.1.4.4.2 Prolifération cellulaire

Les intégrines sont des acteurs essentiels pour le maintien de l'intégrité des tissus. Elles jouent un rôle important dans la croissance cellulaire suite à l'interaction des cellules avec la MEC.

Les intégrines à chaîne $\beta 1$ favorisent la prolifération cellulaire. En effet, Il a été démontré que ces dernières peuvent s'associer au récepteur EGF (Epidermal Growth Factor) à la surface des cellules épithéliales A431 durant l'interaction cellulaire [117]. Les intégrines à chaîne $\beta 1$ ont également été démontrées interagir au niveau des cellules cancéreuses prostatiques avec les récepteurs d'IGF-1 (insulin-like growth factor 1) [118]. L'intégrine $\alpha 6\beta 4$ peut interagir elle aussi avec les récepteurs l'EGF, ErbB2 (Receptor tyrosine-protein kinase) et c-Met alors que l'intégrine $\alpha v\beta 3$ va interagir avec le récepteur au PDGF (platelet-derived growth factor) [119, 120].

Les intégrines régulent la prolifération cellulaire en coopération avec les récepteurs des facteurs de croissance par la modulation de nombreuses voies de signalisation parmi elles les voies AKT, MAPK/ERK, JNK qui régulent la progression des cellules au cours du cycle cellulaire de la phase G1 à S [66, 67, 70, 121].

Les intégrines induisent le recrutement et la phosphorylation de la protéine kinase FAK qui forme une plateforme pour le recrutement des GTPases RhoA, Rac et Cdc42 pour l'activation des voies de signalisation MAPK/ERK et JNK (**figure 11**). FAK interagit avec l'EGFR via la protéine SRC-3Delta4 et régule la migration cellulaire dépendante de l'EGF [122]. Elle interagit également avec les adaptateurs Shc, Grb2 (growth factor receptor-bound protein 2) et SOS (SonofSevenless), pour l'activation de Ras et de la voie MAPK ERK [123]. Suite à son interaction avec les protéines de la famille ERM (ezrin/radixin/moesin) et le NHERF (Na(+)/H(+) exchanger regulatory factor), FAK contrôle indirectement la signalisation dépendante des récepteurs aux facteurs de croissance formant ainsi un lien entre les récepteurs PDGFR ou EGFR et la signalisation des intégrines [124, 125].

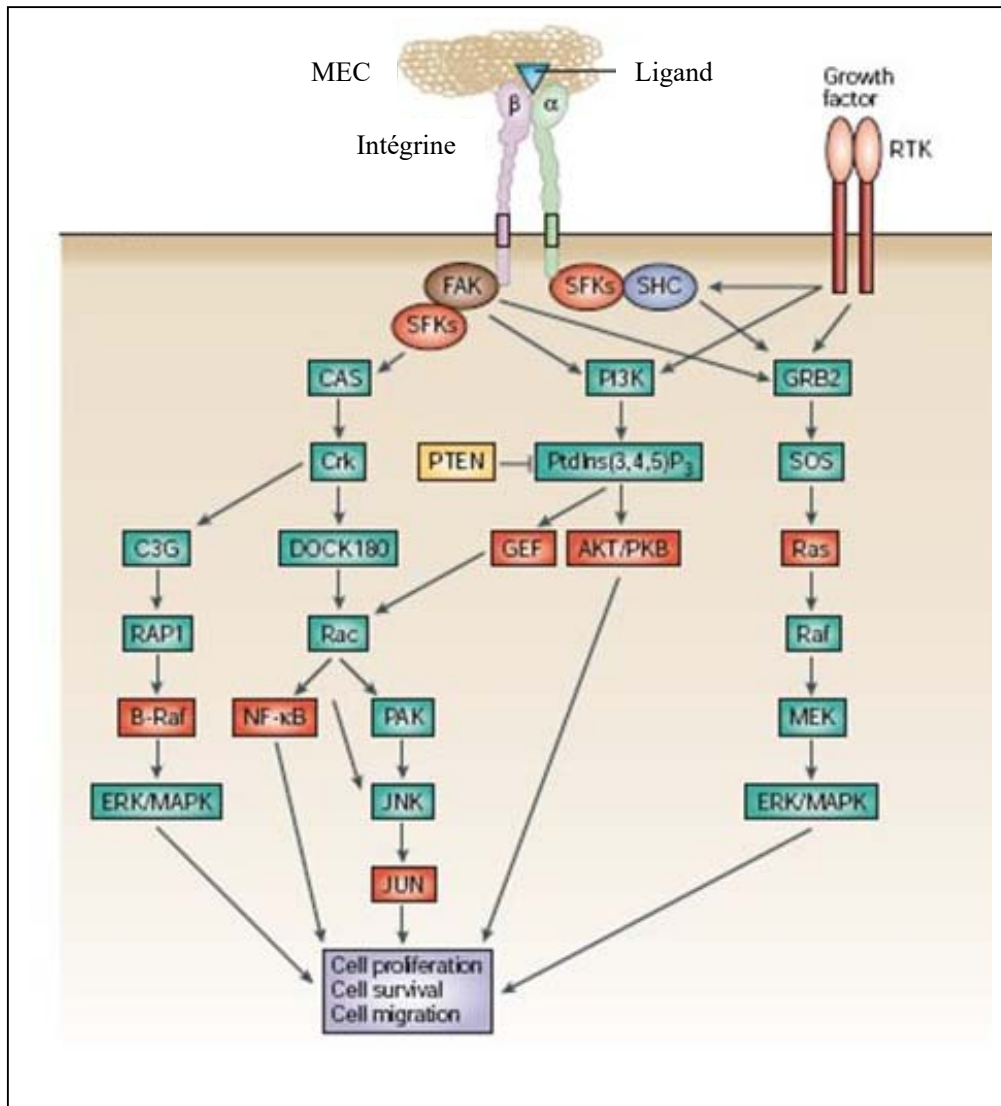


Figure 11: Les voies de signalisation dépendantes des intégrines. Les intégrines peuvent s'associer aux récepteurs tyrosines kinases, afin d'amplifier les signalisations dépendantes de ces récepteurs tel que les voies ERK/MAPK, AKT/PKB et JNK. Adapté de Guo & Giancotti, 2004 [66].

1.2.2.1.4.4.3 Différenciation cellulaire

La MEC joue un rôle important au cours de la différenciation des cellules souches qui subissent différents changements morphologiques et physiologiques pour

donner naissance aux différentes cellules spécialisées de l'organisme. Au cours des différents stades de différenciation de ces cellules, les propriétés physico-chimiques de la MEC telles que la rigidité et les interactions avec les intégrines jouent un rôle primordial dans ce processus. En effet, il a été démontré que le niveau de rigidité de la MEC peut orienter les cellules souches mésenchymateuses vers différents types cellulaires (neuronale, musculaire, adipocytaire ou ostéoblastique) [126]. Le groupe de Brizzi a démontré que la présence d'une MEC souple, comparable à celle trouvée dans le cerveau, induit les cellules souches mésenchymateuses à se différencier vers une orientation neurale [120]. L'interaction des composants de la MEC avec les intégrines joue également un rôle important dans l'induction de la différenciation des cellules souches et leur maintien dans de nombreux organes comme le système hématopoïétique, le cerveau, l'épiderme ou encore la glande mammaire [74, 127, 128, 129]. Il a été démontré que le signal provenant de l'interaction entre l'intégrine $\beta 1$ et du BMP-2 (Nuclear bone morphogenetic protein 2) est nécessaire la différenciation des ostéoblastes [130].

1.2.2.1.4.4.4 Survie cellulaire et l'apoptose

L'apoptose ou mort programmée des cellules est un processus physiologique qui permet l'élimination des cellules âgées, infectées ou dangereuses de l'organisme. L'apoptose est caractérisée par des événements morphologiques comme le bourgeonnement de la membrane plasmique, la condensation et la fragmentation du noyau aboutissant à la formation de plusieurs corps apoptotiques qui sont rapidement phagocytés par les macrophages ou les cellules voisines afin d'éviter une réponse inflammatoire (**figure 12**).

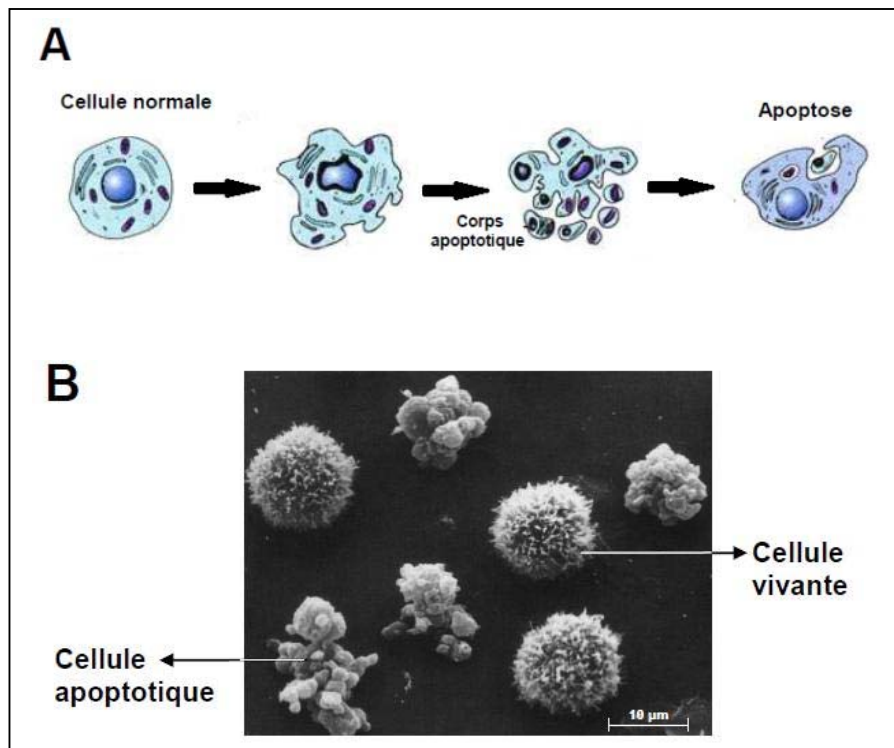


Figure 12: Caractéristiques morphologiques de l'apoptose. A. Schéma du processus d'apoptose. B. Photographie par microscopie électronique à balayage de cellules de sarcome de souris vivantes (couvertes de microvillosités) et en apoptose (décomposition en corps apoptotiques) [131].

L'apoptose joue un rôle essentiel dans l'embryogenèse, l'homéostasie cellulaire, l'atrophie et dans la réponse immunitaire. En effet, au cours de cette dernière, l'apoptose va jouer un rôle clé dans le développement des cellules T en éliminant les lymphocytes dits « auto-réactifs » dans le thymus. Elle joue également un rôle important dans l'élimination des lymphocytes T après la phase d'expansion lors d'une réponse immunologique vis à vis d'un pathogène en mettant fin à l'inflammation ainsi générée. Le dérèglement du processus d'apoptose ou une prolifération cellulaire incontrôlée est à l'origine de nombreuses pathologies comme les cancers, les maladies auto-immunes et inflammatoires comme l'asthme, la broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO), la maladie de Crohn, l'arthrite rhumatoïde, etc.

1.2.2.1.4.4.1 Les caspases: protéases exécutrices de l'apoptose

Le mécanisme par lequel l'apoptose est induite à l'intérieur des cellules diffère selon qu'il provient d'un signal extracellulaire ou d'un signal intracellulaire, cependant, peu importe qu'il s'agisse de la voie des récepteurs de mort ou de la voie mitochondriale, le mécanisme nécessite l'activation de protéases intracellulaires spécifiques, les caspases pour "Cysteiny aspartate specific protease" qui sont des endoprotéases qui possèdent un site catalytique [132]. 14 caspases ont été décrites. Elles sont situées dans le cytoplasme et dans la mitochondrie. Selon leur fonction, ces dernières peuvent être divisées en 3 groupes: les caspases initiatrices de l'apoptose, les caspases effectrices de l'apoptose et les caspases activatrices des cytokines (**figure 13**) [133].

Caspases	Autres noms		Site de clivage (séquence peptidique)	Fonction
2	Ich-1, NEDD2		DEHD	initiateur d'apoptose
9	Mch6, ICE-LAP6		LEHD	
8	Mch5, FLICE, MACH		LETD	
10	Mch4, FLICE-2		LEND	
3	CPP32, Yama, Apopain		DEVD	effecteur d'apoptose
6	Mch2		VEHD	
7	Mch3, ICE-LAP3		DEVD	
1	ICE		WEHD	maturation de cytokines
4	ICE _{rel} II, Tx, Ich-2		(WL)EHD	
5	ICE _{rel} III, Tx, Ty		(WL)EHD	
11			WEHD	
12			WEHD	
13	ERICE		WEHD	
14	MICE		WEHD	

Figure 13: Comparaison structurale des pro-caspases et des différents groupes de caspases. Selon leur fonction, les caspases peuvent être divisées en 3 groupes: les caspases initiatrices de l'apoptose, les caspases effectrices de l'apoptose et les caspases activatrices des cytokines [133].

Le plus souvent, les caspases sont sous forme inactive, leur synthèse aboutit à la formation de proenzymes inactifs (procaspases) dont l'activation nécessite un clivage protéolytique. L'activation des caspases résulte du clivage protéolytique et de l'auto-association de 2 pro-caspases. Elles forment un ensemble tétramérique (homodimère d'hétérodimères) constitué de deux grandes et deux petites sous-unités. En effet, les caspases sont constituées d'un long pro-domaine N-terminal de longueur variable allant de 23 à 219 acides aminés qui joue rôle dans les interactions protéines-protéines et est impliqué dans la régulation de l'activité des caspases. Ce domaine est suivi d'un domaine de 17 à 21 kDa (P20) qui deviendra après clivage la grande sous-unité et enfin, un domaine C-terminal de 10 à 14 kDa (P10) qui constituera la petite sous-unité (**figure 14**).

Les caspases initiatrices 8 et 10 possèdent un domaine effecteur de mort (DED) leur permettant de se lier aux protéines du DISC (death-inducing signaling complex), alors que la caspase 9 possède un domaine CARD (caspase recruitment domain), lui permettant de se lier aux protéines de l'apoptosome [134, 135, 136]. Les caspases effectrices, n'ont ni domaine CARD ni domaine DED et ne peuvent pas être activées par un mécanisme d'auto-activation à cause de leur court domaine (**figure 14**). Leur clivage protéolytique dépend des caspases initiatrices. Ainsi, les caspases-8, -9, et -10 sont décrites comme les protéases gouvernant l'activation séquentielle des caspases effectrices dans l'apoptose médiée par la voie extrinsèque des récepteurs membranaires ou par la voie intrinsèque mitochondriale [137, 138].

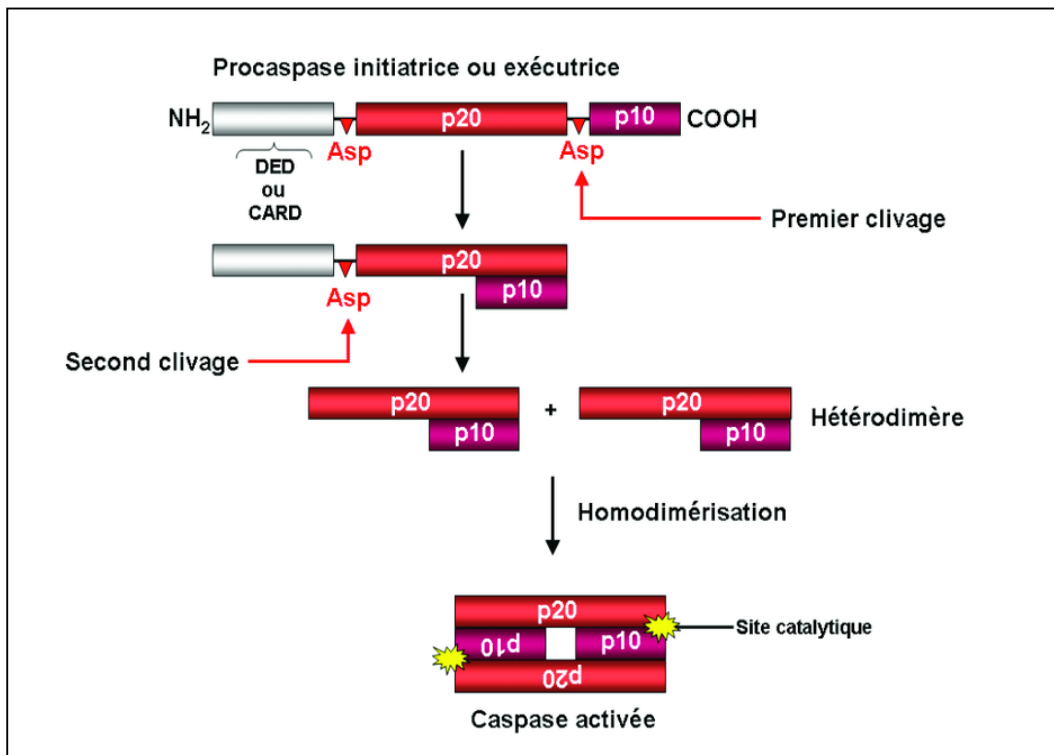


Figure 14: Mécanisme d'activation des caspases. Les caspases sont sous forme inactive. L'activation des caspases résulte du clivage protéolytique et de l'auto-association de 2 pro-caspases. Elles forment un ensemble tétramérique constitué de deux grandes et deux petites sous-unités. Elles sont constituées d'un long pro-domaine N-terminal qui est suivi d'un domaine P20 qui deviendra après clivage la grande sous-unité et un domaine C-terminal P1 qui constituera la petite sous-unité [139].

1.2.2.1.4.4.2 Voies de signalisation de l'apoptose

L'initiation de l'apoptose peut être déclenchée par deux différentes voies: la voie extrinsèque qui implique les récepteurs de mort et la voie intrinsèque ou voie mitochondriale.

1.2.2.1.4.4.2.1 Voie extrinsèque

La voie extrinsèque est déclenchée par la stimulation des récepteurs transmembranaires qui appartiennent à la superfamille des récepteurs du TNF (TNFR), dont les membres principaux sont: le CD95, connu sous le nom de FAS qui a été le premier récepteur identifié, le TNFR1 et les récepteurs TRAILR1 (également connu sous le nom de DR4 et TNFRSF10A) et TRAILR2 (également connu sous le nom de DR5 et TNFRSF10B) [140, 141]. Pour induire le signal de mort, ces récepteurs s'associent à différents ligands, on peut citer: Fas Ligand (Fas-L), TNF- α , APO3-L et TRAIL respectivement (**tableau II**). Ces derniers sont synthétisés sous forme de précurseurs trans-membranaires avant que leurs domaines extracellulaires soient clivés par des métalloprotéases. Ils se lient par la suite à leurs récepteurs sous une forme trimérique [142].

Récepteur	Noms alternatifs	Ligand
TNFR1	TNFRSF1A	TNF, LT α
CD95	TNFRSF6, FAS	CD95L, FAS-LIGAND
DR3	TNFRSF25, TRAMP	TL1A
DR4	TNFRSF10A, TRAILR1	Apo2L, TRAIL
DR5	TNFRSF10B, TRAILR2	Apo2L, TRAIL
DR6	TNFRSF21	?

Tableau II: Les récepteurs de mort et leurs ligands. Nomenclature des récepteurs et des ligands de la superfamille du TNF: FAS, TNFR et TRAILR [142].

Les récepteurs de mort sont caractérisés par un motif extracellulaire riche en résidus cystéines qui permettent la fixation de leurs ligands et un domaine intracellulaire contenant un motif peptidique caractéristique dit domaine de mort (DD; Death Domain) qui permet la transmission du signal apoptotique [143, 144, 145].

La liaison des ligands à la partie N-terminale du domaine extracellulaire de leurs récepteurs respectifs induit la trimerisation de ce dernier et son activation permettant

ainsi l'apparition du domaine de mort intracellulaire du récepteur. Le domaine DD du récepteur interagit avec la protéine adaptatrice intracellulaire FADD (Fas-associated death domain) [146] qui, en plus d'interagir avec le DD du récepteur, possède un domaine effecteur de mort qui permet la liaison des caspases initiateuses 8 et 10. L'ensemble de ces protéines forme le complexe multimoléculaire d'induction de la mort cellulaire, le DISC. Ce complexe clive les deux pro-caspases 8 et 10 induisant ainsi leur activation. Ces dernières à leur tour, dans une boucle d'amplification, activent les caspases effectrices 3 et 7 et induire l'apoptose de la cellule [147, 148].

1.2.2.1.4.4.2.2 Voie intrinsèque

Elle est déclenchée par de nombreux stimuli détectés au niveau intracellulaire comme l'augmentation des ROS, des dommages à l'ADN, le stress du réticulum endoplasmique, l'activation d'oncogènes, etc. Ces divers stress apoptotiques déclenchent l'activation de cette voie qui rend perméable la membrane externe de la mitochondrie (MOMP) et augmente le relargage du cytochrome C [148]. Suite à cette perméabilisation, le cytochrome C va être libéré dans l'espace intermembranaire mitochondrial et s'associe avec la protéine adaptatrice Apaf1 (apoptotic protease-activating factor-1) et la procaspase 9, pour former l'apoptosome. La procaspase 9, après clivage de son prodomaine N-terminal, est alors activée en caspase 9 inductrice [148].

La voie mitochondriale est fortement régulée par les interactions entre les membres de la famille de Bcl2 (B cell lymphoma-2) comme les protéines anti-apoptotiques telles que BCL 2 ou BCL XL, les protéines pro-apoptotiques BH3, BID et BAX et de protéines effectrices pro-apoptotiques BAX, BAK et BOK. La protéine apoptotique BH3 induit l'activation de BAX et BAK au niveau de la membrane externe des mitochondries. Les protéines BCL 2 inhibent la MOMP et la mort cellulaire soit en se liant directement aux protéines BH3 uniquement, soit en se liant à BAX et BAK activés [149].

Les voies intrinsèques et extrinsèques interfèrent également avec le clivage de la caspase 8 qui clive la protéine Bid pour fournir le fragment "T-bid", qui interagit avec la mitochondrie et induit la libération du cytochrome C (**figure 15**) [150].

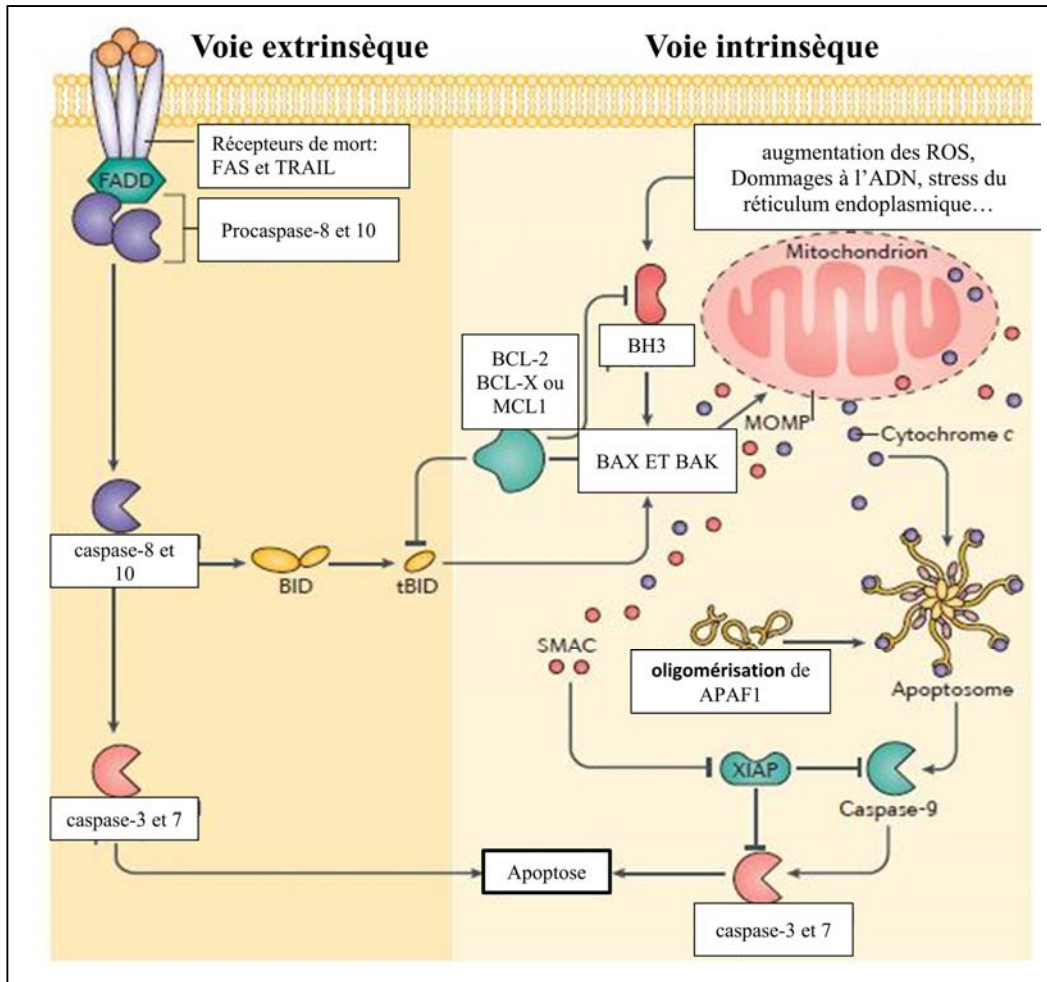


Figure 15: Les voies de signalisation apoptotiques extrinsèques et intrinsèques.

L'apoptose peut être initiée par deux différentes voies: la voie extrinsèque qui implique les récepteurs de morts FAS, TRAIL ou TNF et la voie intrinsèque ou voie mitochondriale [150].

1.2.2.1.4.4.3 Les autres types de mort cellulaire

Il existe d'autres type de mort cellulaire. L'anoïkis est un cas particuliers d'apoptose. Il est induit par le détachement cellulaire de la matrice extracellulaire et est restreint aux cellules non adhérentes. L'anoïkis implique la perte de l'attachement des intégrines $\beta 1$, la diminution de l'expression de l'EGFR, l'inhibition de la signalisation ERK1 et la surexpression de Bim [151].

Un autre type de mort cellulaire est la nécrose. Contrairement à l'apoptose la nécrose est considérée comme une mort cellulaire dite "accidentelle". Elle survient suite à différents événements tels que l'hypoxie, les agents physiques (traumatismes cellulaire, thermiques, radiations), chimiques et infectieux (virus, bactéries). La nécrose entraîne une rupture de la membrane plasmique et à la libération du contenu cytoplasmique dans le milieu environnant, déclenchant ainsi une réaction inflammatoire. La nécroptose est une forme bien décrite de nécrose. Elle est provoquée par l'activation des récepteurs de mort et des récepteurs Toll-like TLR3 et TLR4. L'activation des kinases RIP1 et RIP3 est primordiale dans l'initiation de cette voie et peut être inhibée par la caspase-8 et par les molécules chimiques de type nécrostatines [152]. L'autophagie est un autre type de mort cellulaire. Dans ce dernier, la cellule dégrade son matériel cytoplasmique en utilisant ses propres lysosomes. L'autophagie est initiée par la formation d'une structure multi-membranaire, le phagophore, qui va rassembler l'ensemble des constituants cellulaires à dégrader puis former par la suite l'autophagosome. Le contenu cytosolique séquestré dans cette vésicule à double membrane est finalement dégradé après fusion avec le lysosome [153].

Il existe également différents types de mort cellulaire qui sont spécifique à un type cellulaire. En effet, on retrouve: la netosis qui concerne que les granulocytes neutrophiles et éosinophiles. Les cellules présentent alors une importante vacuolisation cytoplasmique, une décondensation de la chromatine et une rupture de toutes les membranes nucléaires et granulaires [154]. La cornification, qui touche uniquement les kératinocytes, est un processus de mort cellulaire physiologique requis pour la formation de la couche cornée de l'épiderme. Cette mort programmée

des kératinocytes, apparentée à un processus de différenciation terminale, est associée à l'activation de la caspase-14 et des transglutaminases 1, 3 et 5[155].

La pyroptose est restreinte aux macrophages infectés par des pathogènes bactériens. Elle a pu être observée en présence de plusieurs pathogènes comme *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* ou *Bacillus anthracis*. La pyroptose nécessite l'activation de la caspase-1 par une plateforme multiprotéique. La caspase-1 induit la maturation et la sécrétion des interleukines pyrogènes IL-1 β et IL-18[156].

1.2.2.1.4.4.5 Rôle des intégrines dans la survie cellulaire

Les interactions cellule-matrice extracellulaire jouent un rôle majeur dans la régulation des divers processus cellulaires, dont le maintien de la survie [157, 158, 159]. Ces interactions sont principalement assurées par les intégrines [157, 158]. De ce fait, toute perturbation dans les interactions cellule-MEC induit un arrêt du cycle cellulaire et la mort par apoptose: anoïkis [157, 158, 159, 160]. IMD (Integrin-mediated death), un mécanisme distinct de l'anoïkis a également été décrit. Ils'agit d'une apoptose modulée uniquement par les intégrines qui est induit quand les cellules sont toujours adhérentes mais que les intégrines ne sont pas liées à un substrat (**figure 16**).

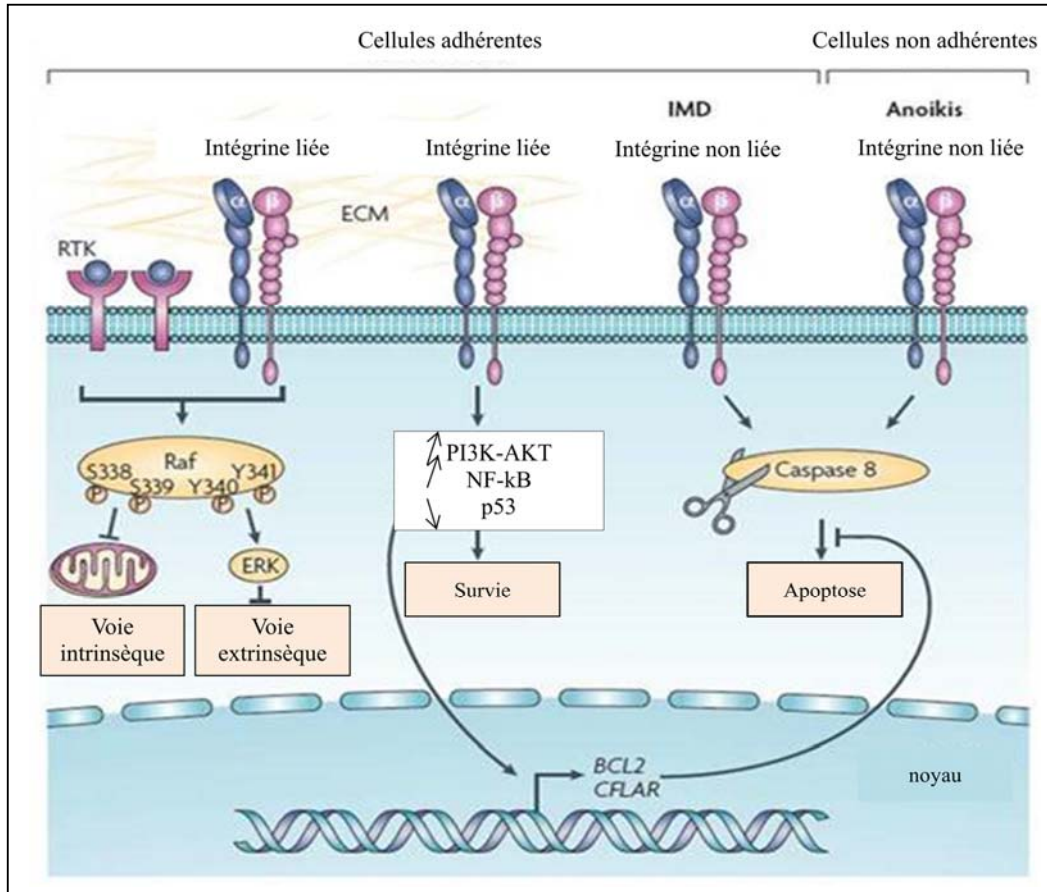


Figure 16: Perturbation dans les interactions cellule-MEC et induction de l'anoïkose. Les intégrines induisent des voies de survie et des voies pro-apoptotiques. La voie qui est la plus active dépend de la liaison par l'intégrine de ligands extracellulaires. Dans les cellules adhérentes dans lesquelles la plupart des intégrines sont non liées, les intégrines induisent l'activation de la caspase 8 déclenchant l'apoptose. En cas de perte totale d'adhérence, la mort cellulaire est initiée par un processus appelé anoïkis. Adapté de Desgrosellier & Cheresch, 2010 [68].

L'anoïkose est induite suite à l'activation des caspases par la voie extrinsèque des récepteurs de mort ou par la voie intrinsèque par le relargage de cytochrome c par les mitochondries [66, 68, 121]. Les intégrines peuvent recruter et activer la caspase-8 et induire la mort cellulaire par apoptose. Il a été rapporté que la perte d'expression

de cette dernière est l'un des mécanismes d'échappement utilisés par les cellules cancéreuses pour survivre et prolifère devenant ainsi insensible à l'anoïkis [160]. Une forte expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 est également un mécanisme utilisé par ces cellules pour induire leur pouvoir métastatique et résistance aux mécanismes de l'anoïkis [161, 162].

Les intégrines ayant la sous-unité $\beta 1$ comme constituants de la MEC jouent un rôle primordial dans la survie de ces cellules en engageant les voies de signalisation comme:PI3-K/Akt, MEK (mitogen-activated protein kinase (MAP) kinase)/Erk (extracellular regulated kinase) ou de SAPK (stress-activated MAP kinases), telles que les protéines JNK et p38. Les voies PI3-K/Akt et MEK/Erk peuvent également être induite par l'intégrines $\alpha 6\beta 4$ exprimées à la surface des cellules épithéliales (**figure 17**) [163, 164, 165].

Les voies de signalisation stimulées par les intégrines $\beta 1$ sont dépendantes de FAK qui est recrutée suite à la liaison de l'intégrine à son ligand de la MEC. Une fois activée, FAK permet la formation du complexe focal d'adhérence par le recrutement de la paxilline, de la taline, de la vinculine et de Src aux microfilaments d'actine (**Figure 17**) [163, 164, 166].

Il a été démontré que l'inhibition de FAK induit fortement l'anoïkis, tandis que sa surexpression inhibe le processus [163, 167, 168]. En effet il a été rapporté que par l'intermédiaire des tyrosines kinases Src ou une IRS, Fak peut activer la voie de PI3-K et induire ainsi l'activation d'Akt. Une fois active, cette dernière va phosphoryler les homologues Bcl-2 pro-apoptotiques Bad et Bax pour les inhiber et renforcer l'état inactif de la pro-caspase 9 (**Figure 17**) [163, 164, 165, 169, 170].

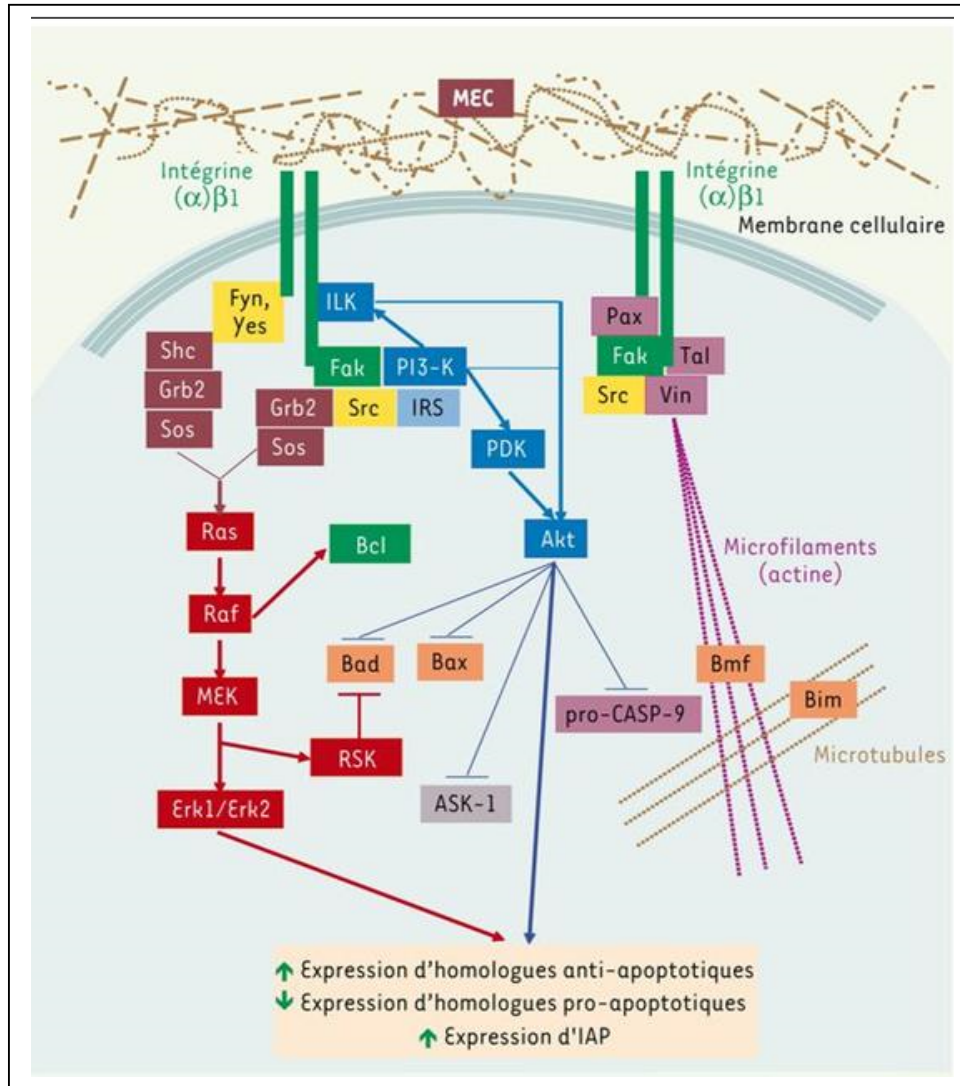


Figure 17: La signalisation intégrines $\beta 1$ -Fak dans la survie cellulaire et la suppression de l'anoïkis. La liaison d'une intégrine $(\alpha) \beta 1$ à son ligand de la matrice extracellulaire (MEC) permet principalement le recrutement et l'activation de Fak. D'une part, Fak active la PI3-K directement, ou indirectement *via* la tyrosine kinase Src ou une IRS, menant à l'activation d'Akt. Akt peut être également activé *via* l'ILK. Akt activé phosphoryle les homologues Bcl-2 pro-apoptotiques Bad et Bax pour les inhiber, en plus de phosphoryler la pro-CASP-9 pour renforcer son état inactif [170].

Par ailleurs, la perturbation des interactions cellules-matrice extracellulaire assurées par les intégrines conduit également à la perte des signaux de survie, causant ainsi une baisse d'activation de molécules/voies de signalisation comme FAK, PI3-K/Akt ou MEK/Erk et l'activation rapide de la caspase 8 qui, à son tour, active les caspases effectrices caspase 3 et caspase 7 et clive l'homologue pro-apoptotique Bid (**Figure 17**) [157, 167, 168]. De plus, la perte d'adhérence des cellules à la MEC conduit à des perturbations dans le cytosquelette et induit la libération des molécules pro-apoptotiques Bim et Bmf qui transloquent le signal vers la mitochondrie, libèrent le cytochrome C et induit l'activation de la caspase-9 et des caspases effectrices (**figure 17**) [157, 167, 168]. La perturbation des interactions cellule-matrice extracellulaire et la perte de la signalisation intégrines-Fak facilite également l'activation de DAPK (death associated protein kinases) de certaines SAPK comme les JNK qui induisent la déstabilisation du cytosquelette et à la dégradation de l'ADN conduisant à l'augmentation de l'expression d'homologues pro-apoptotiques Bim et Bmf, à l'inhibition des molécules anti-apoptotiques comme Bcl-2 et à l'induction de l'anoïkis par l'activation de la caspase 9 [171, 172, 173].

1.2.2.2 L'intégrine α IIb β 3 (GPIIb/IIIa)

L'intégrine α IIb β 3 (GPIIb/IIIa) est un récepteur hétérodimériques calcium dépendant qui représente la glycoprotéine plaquettaire la plus abondante. En effet, on retrouve 50 000 copies sur la membrane des plaquettes et 30 000 copies qui sont stockées dans des granules plaquettaires qui s'expriment sur les plaquettes suite à leur activation [174, 175, 176, 177].

1.2.2.2.1 Structure et expression

La sous unité α IIb est associée par des liaisons non covalentes avec une chaîne de la sous unité β IIIa pour former le complexe GPIIb/IIIa [178]. La sous-unité α IIb (GPIIb) a un poids moléculaire de 142 kDa [179]. Elle forme un dimère constitué

d'une chaîne lourde et d'une chaîne légère qui sont reliées entre elles par un pont disulfure.

La chaîne lourde extracellulaire a un poids moléculaire de 125 kDa et la chaîne légère de 25 kDa [180, 181]. La sous-unité $\beta 3$ (GPIIIa) a un poids moléculaire de 95 kDa [178]. Elle est constituée d'une seule chaîne polypeptidique de 762 aa [182, 183]. Elle comporte 3 domaines: un domaine PSI (plexines, semaphorines et intégrines) qui est localisé à l'extrémité N-terminale de la sous-unité, un domaine I qui contient deux sites de reconnaissance RGD, il est responsable de l'interaction des différents ligands avec le récepteur et enfin, un domaine apparenté au facteur de croissance épidermique ("Epidermal Growth Factor", EGF) caractérisé par une série de quatre boucles riches en cystéines possédant une activité régulatrice importante au niveau fonctionnel [184, 185, 186].

L'intégrine $\alpha \text{IIb}\beta 3$ est exclusivement exprimée sur les plaquettes et les mégacaryocytes. L'interaction avec ses ligands naturels le fibrinogène et la vitronectine au niveau des séquences RGD est impliquée dans la fonction plaquettaire et la thrombose [187, 188].

1.2.2.2.2 Rôle de l'interaction de $\alpha \text{IIb}\beta 3$ avec ses ligands naturels

L'intégrine $\alpha \text{IIb}\beta 3$ est l'intégrine la plus exprimée à la surface des plaquettes. La liaison de cette dernière avec ses ligands naturels le fibrinogène soluble et le facteur de von Willebrand favorise l'adhérence et l'agrégation des plaquettes ainsi que la formation du Thrombus. De ce fait, l'intégrine $\alpha \text{IIb}\beta 3$ joue un rôle important dans l'hémostase. L'intégrine $\alpha \text{IIb}\beta 3$ est ciblée par plusieurs médicaments bloquants comme l'abciximab, le tirofiban [189].

1.2.2.2.3 Interaction avec α IIb β 3/CD154

L'intégrine α IIb β 3 a été identifiée en 2002 par André et al comme étant un récepteur pour le CD154 [190, 191]. Les deux formes active et inactive de α IIb β 3 peuvent lier le CD154 par son motif KGD chez l'humain et le RGD (arginine-glycine-acide aspartique) chez la souris [191]. L'interaction du CD154 avec l'intégrine α IIb β 3 se fait au niveau du résidu D117 (acide aspartique) du CD154 vu qu'une mutation à ce niveau diminue considérablement cette interaction [192]. L'affinité de liaison du CD154 à l'intégrine α IIb β 3 est de ~ 30 nM (**tableau III**) [196].

Receptor	Binding residues (CD40L)	Binding residues (receptor)	Affinity (nM)
CD40	Y ¹⁴⁵ , R ²⁰³ (50, 51) K ¹⁴³ (51) Y ¹⁴⁶ , Q ²²⁰ (52) E ¹²⁹ , S ¹³² , T ¹³⁴ , E ¹⁴² (53)	Y ⁸² , D ⁸⁴ , N ⁸⁶ (51) E ⁷⁴ , E ¹¹⁷ (52)	~ 0.5 –7 (37, 38)
α IIb β 3	D ¹¹⁷ (54)	unknown	~ 30 (54, 55)
Mac-1	Y ¹⁴⁵ , R ²⁰³ (50)	E ¹⁶² -L ¹⁷⁰ (56)	~ 200 (56)
α 5 β 1	N ¹⁵¹ , Q ¹⁶⁶ (50)	unknown	~ 120 (55)

Tableau III: Propriétés de liaison du CD154 avec ses différents récepteurs [196].

Il a été démontré que l'interaction du sCD154 avec l'intégrine α IIb β 3 induit la phosphorylation des résidus tyrosines au niveau du domaine cytoplasmique de β 3 pouvant ainsi jouer un rôle dans la stabilisation du thrombus artériel [194]. D'autres travaux ont démontré que le CD154 peut jouer le rôle d'un agoniste et peut déclencher une signalisation outside-in qui induit l'activation des plaquettes, leur diffusion et la formation de microparticules plaquettaires [194]. Ces événements de signalisations induits par l'interaction du CD154 à α IIb β 3 dans les plaquettes sont dus via les voies de signalisation via p38 et ERK $\frac{1}{2}$ (**figure 18**) [187, 193]. Par ailleurs, il a été démontré que l'activation de l'intégrine α IIb β 3 par le CD154 ou par

ses ligands naturels, induit l'adhérence des plaquettes et augmente le temps d'exposition du CD154 à la surface plaquettaire renforçant ainsi l'interaction des plaquettes avec les cellules exprimant le CD154.

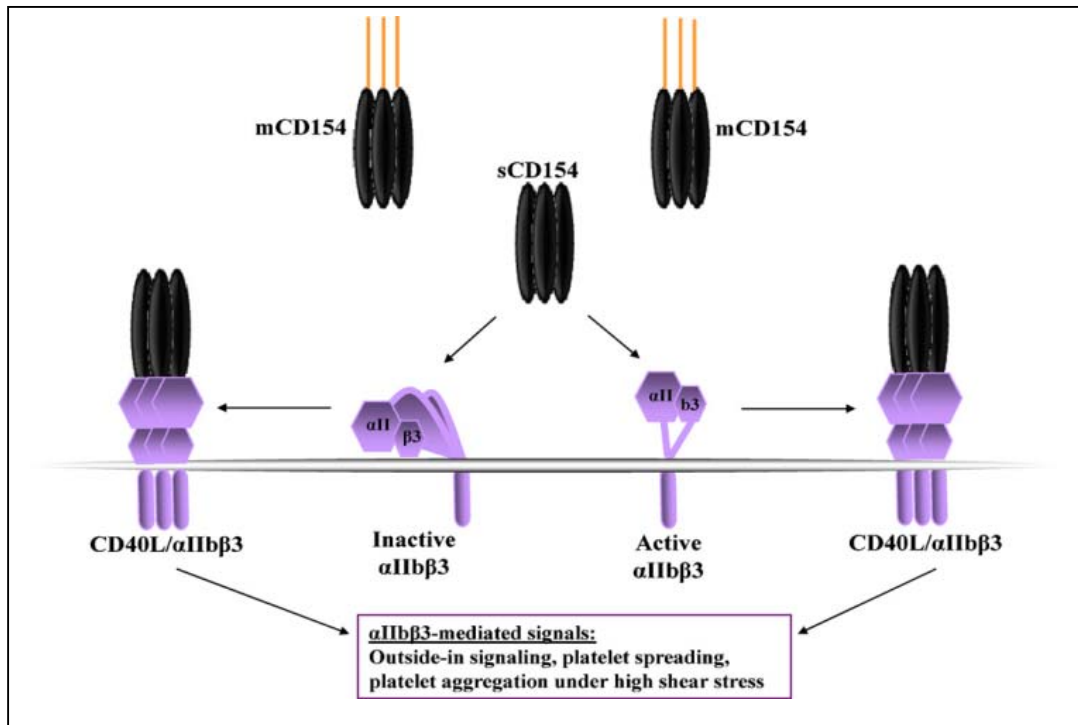


Figure 18: La liaison du CD154 avec $\alpha IIb\beta 3$. Le CD154 sous forme trimerique peut se lier à l'intégrine $\alpha IIb\beta 3$ sous sa forme active ou inactive et induire différentes réponses biologiques [187].

1.2.2.3 L'intégrine $\alpha 5\beta 1$

1.2.2.3.1 Structure et expression

L'intégrine $\alpha 5\beta 1$, également appelée VLA5, est un hétérodimère composé de deux sous-unités: la sous unité $\alpha 5$ (CD49e) ayant un poids moléculaire de 160 kDa et la sous unité $\beta 1$ (CD29) ayant un poids moléculaire de 130 kDa. Le gène de l'intégrine $\alpha 5$ humaine code pour un précurseur de 1049 acides aminés (aa) composé d'une séquence signal de 41 aa, un domaine extracellulaire de 954 aa, un domaine

transmembranaire de 26 aa et un domaine cytoplasmique de 28 aa. Le gène de l'intégrine $\beta 1$ humaine code pour un précurseur de 798 aa qui comprend une séquence signal de 20 aa, un domaine extracellulaire de 708 aa, un domaine transmembranaire de 23 aa et un domaine cytoplasmique de 47 aa (**figure 25**) [197, 198, 199]. La fibronectine constitue le principal ligand de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$. Une mutation au niveau de la séquence RGD de la fibronectine abolit sa liaison avec l' $\alpha 5\beta 1$ [200, 201]. L' $\alpha 5\beta 1$ peut également se lier à la séquence RGD du fibrinogène [202, 203]. La liaison de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ avec la fibronectine et le fibrinogène est favorisée par les ions Mn^{2+} et défavorisée par lésions Ca^{2+} [202, 203].

Plusieurs tissus expriment l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dont la peau, le muscle cardiaque, les intestins, les poumons, les amygdales, les vaisseaux sanguins et la rétine [204]. Elle est exprimée à la surface des cellules immunitaires comme les lymphocytes T et B, les monocytes, les macrophages, les plaquettes, et les cellules dendritiques [205, 206]. L'expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ peut être régulée par plusieurs cytokines comme le TGF- β ou l'IL-6 qui augmente la transcription ainsi que la traduction de la sous-unité $\alpha 5$ [207]. Un effet synergique du TGF- β et du FGF (fibroblast growth factors) augmente également l'expression de la sous-unité $\alpha 5$ [208, 209]. D'autres molécules comme la PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) induit également la surexpression la sous unité $\alpha 5$ [210]. D'autres études ont montré qu'une surexpression de la fibronectine induit une augmentation d'expression de son récepteur au niveau des nerfs périphériques [211, 212].

1.2.2.3.2 Rôle de l'interaction de $\alpha 5\beta 1$ avec ses ligands naturels

La liaison de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ à ses ligands naturels la fibronectine et la vitronectine au niveau de leurs séquences tripeptidiques RGD, induit plusieurs réponses dont: l'adhérence cellulaire, la migration cellulaire, la prolifération cellulaire ainsi que dans la survie [213,214, 215]. L'interaction de la fibronectine avec l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ joue un rôle important dans le processus d'angiogenèse des cellules endothéliales, en effet, cette interaction induit la fixation, la diffusion, la migration et la prolifération des cellules endothéliales sur la MEC [216,217, 218]. L'interaction de

la fibronectine avec l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ joue aussi un rôle important dans les fonctions phagocytaires des macrophages ainsi que leur attachement sur les tissus lors de la réponse inflammatoire [219, 220]. Par ailleurs, elle permet l'adhérence des plaquettes aux surfaces de fibrinogène [221]. Au niveau des cellules musculaires lisses, la liaison de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ avec ses ligands naturels est impliquée dans l'adhérence cellulaire et la migration des cellules vers la matrice extracellulaire. Il a été démontré que l'interaction de $\alpha 5\beta 1$ avec ses ligands naturellement potentialise les canaux Ca^{2+} dans les cellules musculaires lisses et joue un rôle dans la contraction de ces cellules et leur fonction dans l'homéostasie des vaisseaux sanguins [222, 223].

Au niveau des cellules T, la liaison de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ avec ses ligands naturels intervient dans plusieurs fonctions. En effet, cette dernière induit la migration et l'adhérence des lymphocytes T du sang périphérique et les lignées Jurkats in vitro sur des matrices de fibrinogène et de collagène [224, 225]. L'activation de ces cellules avec le PMA, et l'anti-TCR renforce les fonctions migratoires et d'adhérence aux matrices [226, 227]. L'engagement de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ des lymphocytes T activés augmentant la phosphorylation de FAK induite par le TCR et induit la prolifération de ces cellules [228, 229, 230]. Cette prolifération est accompagnée par la production d'IL-2 dans les lymphocytes T naïfs [231]. L'engagement de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ des lymphocytes T effecteurs/mémoires, augmentant la prolifération de ces cellules et la production des cytokines pro-inflammatoires comme l'INF γ et le TNF α [232].

Par ailleurs, plusieurs travaux ont rapporté le rôle important que joue les intégrines lymphocytaires de la famille $\beta 1$ dans la survie des cellules T. En effet, l'engagement des intégrines $\beta 1$ induit l'activation de plusieurs voies de signalisation comme les MAPK (p38/ERK1/2) et les PI3K/Akt. Ces dernières augmentent la survie des lymphocytes T en inhibant l'apoptose médiée par le récepteur Fas par l'inhibition du clivage des caspases initiateurs de l'apoptose la caspase-8 et 9 ainsi que les protéines pro-apoptotiques Bid [233, 234, 235, 236, 237, 238]. Cette inhibition est suivie par une surexpression des protéines anti-apoptotiques Bcl κ L et Bcl-2 augmentant ainsi la survie des cellules T [239, 240].

1.2.2.3.3 Interaction avec $\alpha 5\beta 1$ /CD154

L'intégrine $\alpha 5\beta 1$ a été identifiée comme étant un récepteur du CD154 par Lévêillé et al en 2007 dans les lignées monocytaires humaines U937 [61]. Contrairement à l'intégrine $\alpha \text{IIb}\beta 3$ qui, sous ses deux formes peut se lier au CD154 et l'intégrine $\alpha \text{M}\beta 2$ qui se lie au sous sa forme active, l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ se lie au CD154 seulement sous sa forme inactive (**figure 19**) [187, 241]. L'interaction CD154/ $\alpha 5\beta 1$ est dépendante des résidus Asparagine 151 (N151) et Glutamine 166 (Q166) du CD154 et indépendamment des résidus impliqués dans l'interaction du CD154 avec le CD40 [242]. Dans ces cellules monocytaires U937, la liaison du CD154 à l' $\alpha 5\beta 1$ induit la phosphorylation de ERK1/2 et l'expression de l'ARNm de l'IL-8 dans ces cellules [241].

Par ailleurs, il a été démontré que l'interaction CD154/ $\alpha 5\beta 1$ est impliquée dans l'asthme en augmentant la production de l'IL-6 et maintient l'inflammation au niveau de la muqueuse pulmonaire suite à l'interaction des lymphocytes T avec les fibroblastes bronchiques [243]. D'autres travaux ont montré par la suite le rôle de cette interaction dans rôle de CD154/ $\alpha 5\beta 1$ dans l'activation plaquettaire [244] et la thrombose [245].

Il a été démontré par Takada K. et al, que l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ se lie au CD154 au niveau de son interface trimérique. Ils ont pu identifier plusieurs mutations dans le CD154 induisant le syndrome d'hyper IgM de type 1 (HIGM1). Ces derniers sont regroupées dans l'interface trimérique du CD154 et empêche sa liaison avec l'intégrine $\alpha 5\beta 1$, suggérant que l'interaction CD154/ $\alpha 5\beta 1$ pourrait être un facteur causal de la maladie [63].

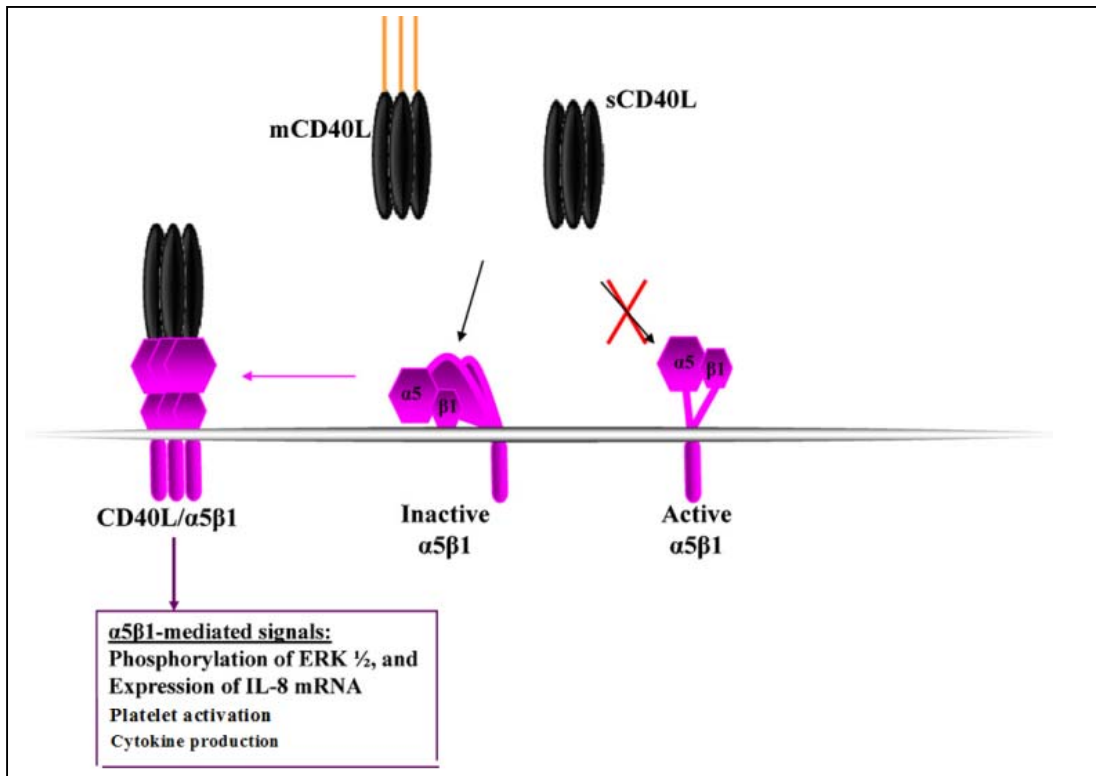


Figure 19: La liaison du CD154 à l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$. Le CD154 sous sa forme trimérique est capable de se lier à l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ sous sa forme inactive seulement. Cette liaison induit la phosphorylation de ERK1/2 et l'expression de l'ARNm de l'IL-8 dans ces cellules. Par ailleurs, l'interaction CD154/ $\alpha 5 \beta 1$ est impliquée dans l'asthme en augmentant la production de l'IL-6 et maintient l'inflammation [187].

1.2.2.4 L'intégrine $\alpha M \beta 2$ (Mac-1)

1.2.2.4.1 Structure et expression

Intégrine $\alpha M \beta 2$, également appelée MAC-1 ou récepteur du type 3 (CR3), appartient à l'une des trois intégrines $\beta 2$ des leucocytes. C'est un hétérodimère composé de deux sous unités, la sous unité αM (CD11b) de 170 kDa et la sous unité $\beta 2$ (CD18) de 95 kDa qui sont liées par des liaisons non covalentes. Chaque sous-unité est composée d'un long domaine extracellulaire avec 1088 aa pour la sous unité αM et 678 aa pour la sous unité $\beta 2$ qui est surmené du I domaine dans son

extrémité N-terminale. Ce dernier contient des sites de liaison pour la fixation du ligand à l'intégrine. Les sous unités sont composées aussi d'un domaine transmembranaire et un très court domaine cytoplasmique. L'intégrine $\alpha M\beta 2$ interagit avec un large répertoire de différents ligands, y compris le fragment d'opsonine complémentaire iC3b, ICAM-1, les protéines de coagulation fibrinogène, fibronectine, vitronectine, héparine, GPIba, RAGE, récepteur de la protéine C endothéliale (EPCR), et autres [246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254].

L'intégrine $\alpha M\beta 2$ est principalement exprimé sur les cellules myéloïdes, telles que les monocytes, les macrophages et les neutrophiles, mais peut également être exprimée sur les cellules NK et, dans une moindre mesure, sur certains sous-ensembles de cellules B (B1), cependant, l'abondance la plus élevée d'ARNm de la sous-unité α CDMb (Itgam) se limite aux neutrophiles et aux macrophages [196].

1.2.2.4.2 Rôle de l'interaction de $\alpha M\beta 2$ avec ses ligands naturels

L'intégrine $\alpha M\beta 2$ est l'une des intégrines $\beta 2$ la plus caractérisée. Comme décrit plus haut, cette dernière est exprimée sur les neutrophiles polymorphonucléaires (PMN), les monocytes, les macrophages ($M\phi$), certains sous-ensembles de lymphocytes T cytotoxiques et sur les cellules NK.

L'intégrine $\alpha M\beta 2$ peut interagir avec de nombreux ligands. Suite à ces interactions, $\alpha M\beta 2$ est impliquée dans diverses réponses y compris la migration, l'activation cellulaire, la phagocytose, la production de chimiokines et de cytokines [255, 256, 257].

1.2.2.4.3 Interaction avec $\alpha M\beta 2$ /CD154

L'intégrine $\alpha M\beta 2$ a été identifiée comme récepteur du CD154 par Zirlik et al en 2007 [62]. En effet, la liaison du sCD154 aux monocytes activés par PMA ou sur

les cellules ovariennes d'hamster chinois (CHO) transfectées avec la forme active de Mac-1 ont été inhibées par des anticorps anti-Mac-1 [62]. Le CD154, se lie à la forme active de l' $\alpha M\beta 2$ seulement. Cette liaison se fait via la séquence EQLKKSKTL du domaine-I de l' $\alpha M\beta 2$ [258]. Par ailleurs, notre laboratoire a démontré que l'intégrine $\alpha M\beta 2$ et le CD40 partage les mêmes résidus Y145 et R203 lors de leurs interactions avec le CD154 [242]. L'interaction du CD154 avec la forme active de $\alpha M\beta 2$, induit l'adhésion, la migration des monocytes et la libération de la myeloperoxidase [8]. Il a également été démontré que la liaison du CD154 à $\alpha M\beta 2$ jouait un rôle dans l'athérosclérose. En effet, dans un modèle d'athérosclérose dans les souris, l'inhibition de cette interaction diminue le développement des plaques artérielles ainsi que l'accumulation des macrophages dans le site d'inflammation [8]. Il a été démontré récemment que l'interaction CD154/ $\alpha M\beta 2$ favorise la production de l'IL-12 et le maintien d'une réponse Th1 chez les souris infectées avec *L.major* (**figure 20**) [187, 259].

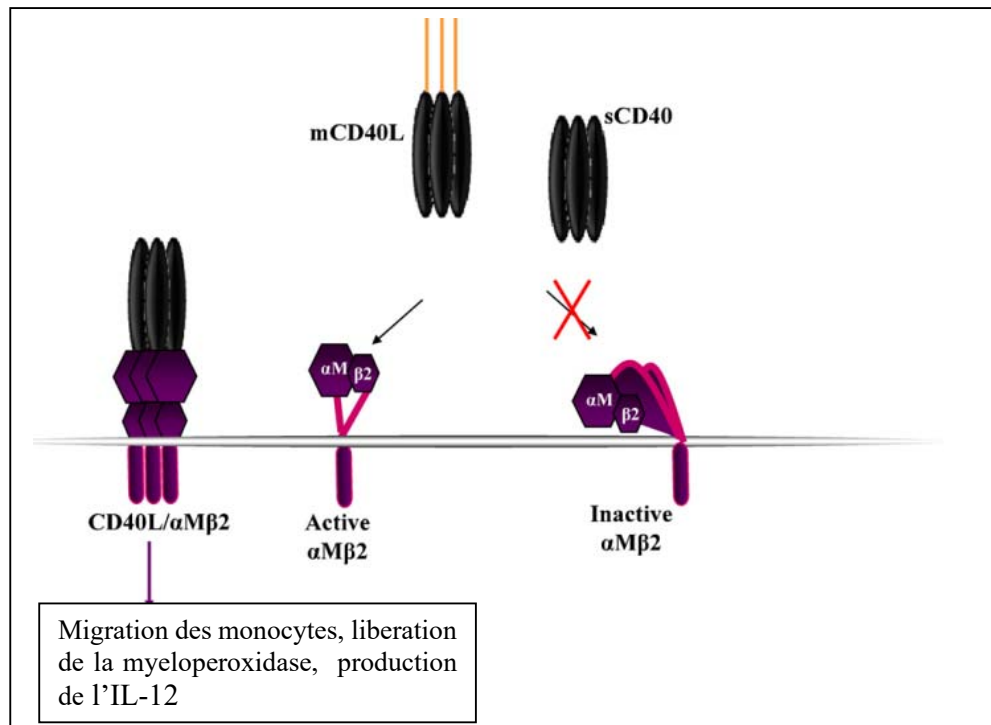


Figure 20: Liaison du CD154 à l'intégrine $\alpha M\beta 2$. Le CD154, se lie à la forme active de l' $\alpha M\beta 2$ seulement et induit l'adhésion, la migration des monocytes et la libération de la myeloperoxidase et favorise la production de l'IL-12 et le maintien d'une réponse Th1 chez les souris infectées avec *L.major* [187].

1.2.2.5 L'intégrine $\alpha\beta3$

L'intégrine $\alpha\beta3$ est spécifiquement exprimée sur les cellules endothéliales. Différents ligands de la matrice extracellulaire dont la vitronectine, la fibronectine, la thrombospondine, le fibrinogène et l'ostéopontine se fixent à l'intégrine $\alpha\beta3$ via la séquence tripeptidique RGD [260]. Plusieurs travaux ont démontré que l'interaction de $\alpha\beta3$ avec ses ligands naturels est impliquée dans les maladies vasculaires mais également dans le cancer du rein. Par conséquent, plusieurs inhibiteurs de $\alpha\beta3$ sont utilisés dans le traitement de ces pathologies [260, 261]. L'intégrine $\alpha\beta3$ a été identifiée comme récepteur du CD154 par Takada et al en 2019 [63]. Cependant, le rôle de l'interaction CD154/ $\alpha\beta3$ n'a pas encore été clairement établi.

1.3 Interaction possible du CD154 avec plusieurs récepteurs en simultanée sur le même type cellulaire

Plusieurs évidences portent à croire que le CD154 peut interagir simultanément avec plusieurs de ces récepteurs et pourrait induire des voies de signalisation différentes ou parallèles dans la cellule, conduisant au développement de réponses immunitaires et inflammatoires dans les cellules qui les expriment. Tout d'abord, le CD154 forme des trimères qui sont biologiquement actifs et pouvant interagir avec l'un de ses récepteurs: le CD40, l' $\alpha\text{IIb}\beta3$, l' $\alpha5\beta1$ et l' $\alpha\text{M}\beta2$ et activer différentes voies de signalisation en aval qui vont induire différentes réponses biologiques (figure 21).

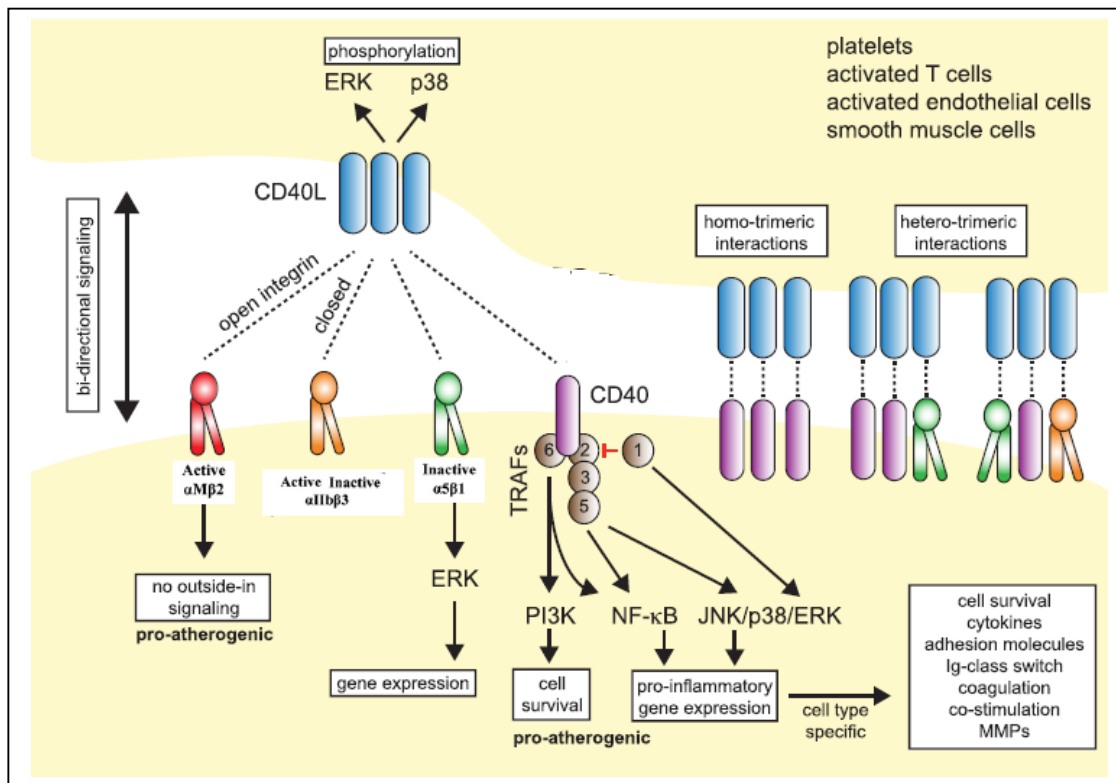


Figure 21: Modèle d'interaction du CD154 avec différents récepteurs. Le CD154 forme des trimères biologiquement actifs pouvant interagir avec l'un de ses récepteurs connus, les intégrines $\alpha\text{IIb}\beta 3$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha\text{M}\beta 2$ (Mac-1) ou son récepteur le CD40. La liaison du CD154 à un récepteur induit des événements de signalisation bidirectionnels dans les cellules CD154 positives. Cette dernière peut se présenter de manière homotrimérique, où hétérotrimérique [196].

Par ailleurs, le CD154 est une molécule de signalisation qui peut induire un signal bidirectionnel. En effet, il a été démontré que les différents récepteurs du CD154 sous forme soluble peuvent interagir avec des cellules exprimant le CD154 et induire la voie de signalisation MAPK [187, 196]. Par ailleurs, bien que les nouveaux récepteurs du CD154 soient tous membres de la même famille des intégrines, chacun d'eux se lie au CD154 de façon différente. En effet, les deux formes active et inactive de $\alpha\text{IIb}\beta 3$ peuvent lier le CD154 par son motif KGD, alors que seulement la forme inactive de $\alpha 5\beta 1$ et active de $\alpha\text{M}\beta 2$ qui va lier le CD154 [187]. Notre laboratoire a également démontré que différents résidus sont impliqués dans sa liaison avec les intégrines, alors que les résidus N151 et Q166 de CD154

sont impliqués dans son interaction avec $\alpha 5\beta 1$, les résidus Y145 et R203 sont partagés à la fois par CD40 et $\alpha M\beta 2$ pour lier le CD154 [187]. De plus, différentes cellules peuvent exprimer à leur surface plusieurs récepteurs du CD154 au même temps, on peut citer: les neutrophiles, les monocytes, cellules vasculaires, qui expriment le CD40 et l'intégrine $\alpha 5\beta 1$. Les plaquettes qui expriment le CD40, l' $\alpha 5\beta 1$ et l' $\alpha IIb\beta 3$ à leur surface. Les neutrophiles, les monocytes et les macrophages peuvent exprimer le CD40, $\alpha 5\beta 1$ et $\alpha M\beta 2$. Suite à leur liaison avec le CD54, les récepteurs peuvent entraîner différentes combinaisons de ligand/récepteur entraînant une interaction homotrimères ou hétérotrimères (**figure 22**).

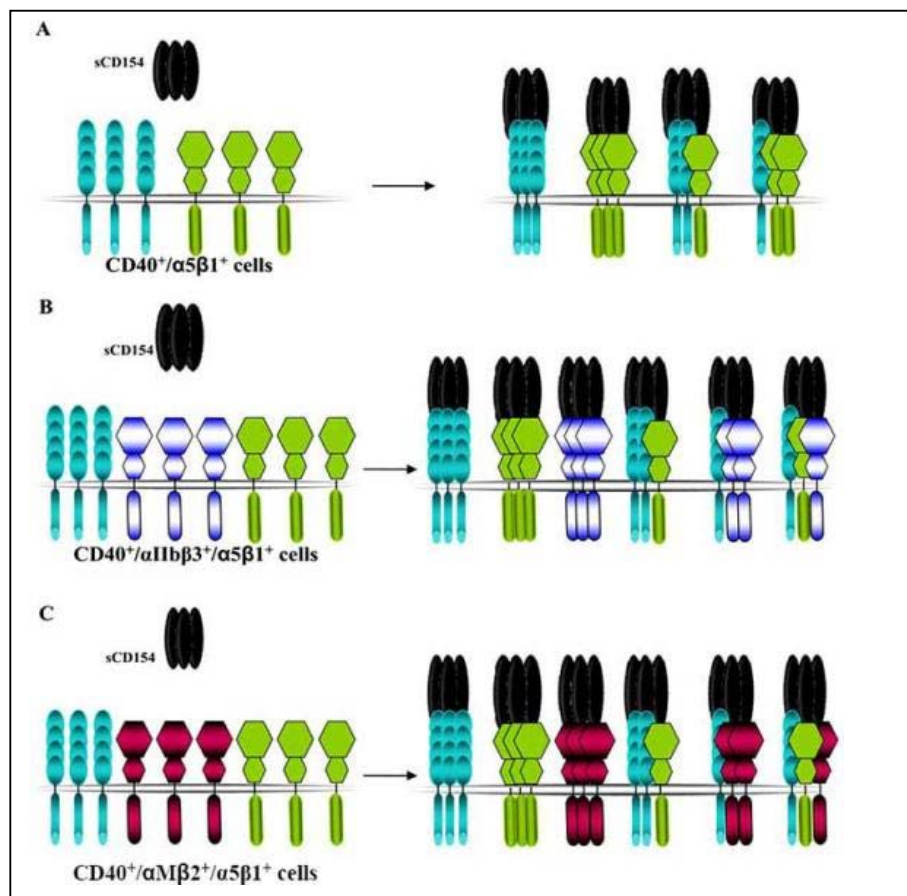


Figure 22: L'interaction du CD154 avec différents récepteurs exprimés à la surface d'une même cellule. Modèle montrant la possibilité d'une interaction simultanée du CD154 avec plusieurs récepteurs exprimés sur le même type cellulaire: (A) sur les cellules CD40⁺/ $\alpha 5\beta 1$ ⁺, (B) sur les cellules CD40⁺/ $\alpha 5\beta 1$ ⁺/ $\alpha IIb\beta 3$ ⁺, (C) sur les cellules CD40⁺/ $\alpha 5\beta 1$ ⁺/Mac-1⁺ (CD40⁺/ $\alpha 5\beta 1$ ⁺/ $\alpha M\beta 2$ ⁺) [187].

1.4 Rôle de l'interaction du CD154 avec ses différents récepteurs dans les pathologies

1.4.1 Rôle de l'interaction CD40/CD154

1.4.1.1 Dans l'athérosclérose

L'athérosclérose est une maladie inflammatoire de la paroi artérielle. A l'origine d'évènements ischémiques aigus tels que l'infarctus du myocarde, l'accident vasculaire cérébral ou l'artériopathie oblitérante des membres inférieurs, l'athérosclérose est la cause principale des maladies cardiovasculaires [13]. Elle est caractérisée par la formation dans la paroi des artères de plaques athéromateuses, conséquence d'une accumulation de dépôts lipidiques LDL dans les macrophages [13]. Ce dépôt mène à la formation de macrophages spumeux qui caractérisent le début de la lésion d'athérosclérose. L'environnement inflammatoire causé par le recrutement des cellules immunitaires dans les plaques athéromateuses ainsi que le dysfonctionnement des cellules endothéliales, joue un rôle important dans l'initiation de la plaque d'athérome. L'augmentation de l'inflammation dans la plaque par ces cellules fait progresser la lésion et peut la rendre vulnérable entraînant la rupture de celle-ci et la formation d'un thrombus [13].

Le rôle du CD154 avec ses récepteurs dans l'athérosclérose est très complexe car les plaquettes expriment trois différents récepteurs du CD154: le CD40, l' α IIb β 3 et l' α 5 β 1. Il a été démontré que l'interaction CD40/CD154 est impliquée dans toutes les étapes de la pathogenèse de athérosclérose soit: l'initiation, la progression et la stabilité de la plaque. Durant la phase d'initiation, le CD154 et le CD40 sont exprimés par toutes les cellules impliquées dans la pathogenèse de l'athérosclérose (cellules endothéliales, lymphocytes T, monocytes/macrophages et cellules musculaires lisses) (**figure 23**). Ils sont impliqués dans l'activation des cellules endothéliales ainsi que dans le recrutement et l'infiltration de cellules inflammatoires immunocompétentes telles que les lymphocytes T, les monocytes et les neutrophiles dans l'espace sous-endothélial [13, 187, 196].

L'interaction du CD40 des cellules endothéliales activées avec le CD154 exprimé à la surface des cellules T activées, amplifie le recrutement de ces cellules immunitaires aux sites de lésions, par la production de diverses cytokines moléculaires proinflammatoires et de chimiokines comme: l' IL-8, MCP-1, MCP-3, RANTES, IL-6 et IL-15 et augmente l'expression de plusieurs molécules d'adhérences (E-sélectine, P-sélectine, VCAM-1, ICAM-1 et LFA-1) qui permettent l'adhésion et la transmigration des monocytes et les cellules T à travers la couche endothéliale [262, 263, 13, 264, 265]. Le CD154 amplifie également l'environnement proinflammatoire par la régulation à la baisse de l'ARNm et de la protéine endothéliale NOS (nitric oxide synthase) et augmente la production de l'anion superoxyde (O_2^-) [266]. Par ailleurs, dans la phase de progression, l'interaction du CD154 des lymphocytes T infiltrés interagit avec le CD40 des macrophages modifiés (cellules spumeuses) et permet la libération de plusieurs cytokines, notamment IL-1, IL-6, IL-12 et TNF- α [267].

Le sCD154 participe également à la prolifération et à la migration des cellules musculaires lisses vers l'intima en régulant positivement les niveaux d'ARNm et la protéine des et de MMP-9 [268]. Le CD154 contribue au maintien de l'environnement inflammatoire par l'induction de la sécrétion des cytokines MCP-1 et IL-8[269, 261]. Le CD154 est aussi impliqué dans la stabilité de la plaque. Il va induire la sécrétion accrue de plusieurs MMPs qui sont les molécules clés, responsables de ce phénomène. On peut citer: la MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9 et la MMP-13 qui sont produites suite à la stimulation des cellules endothéliales, des cellules musculaires lisses et des macrophages par le CD154 [270, 271, 272]. La rupture d'une lésion instable, peut conduire à l'athéro-thrombose qui est déclenchée par l'activation des plaquettes et les processus de coagulation conduisant à la formation d'un caillot. Plusieurs études ont démontré l'implication du CD154 et du CD40 dans la formation de ce dernier. En effet, la liaison du CD40 sur les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les macrophages provoque une libération accrue de substances pro-coagulantes, tel que le facteur tissulaire, initiant la cascade de la coagulation, et induisant l'activation des plaquettes menant à l'agrégation plaquettaire et à la formation de thrombus [273, 274]. Egalement, au niveau des plaques athérosclérotiques il a été démontré une

co-localisation du CD154 et de son récepteur le CD40 avec le facteur tissulaire [260].

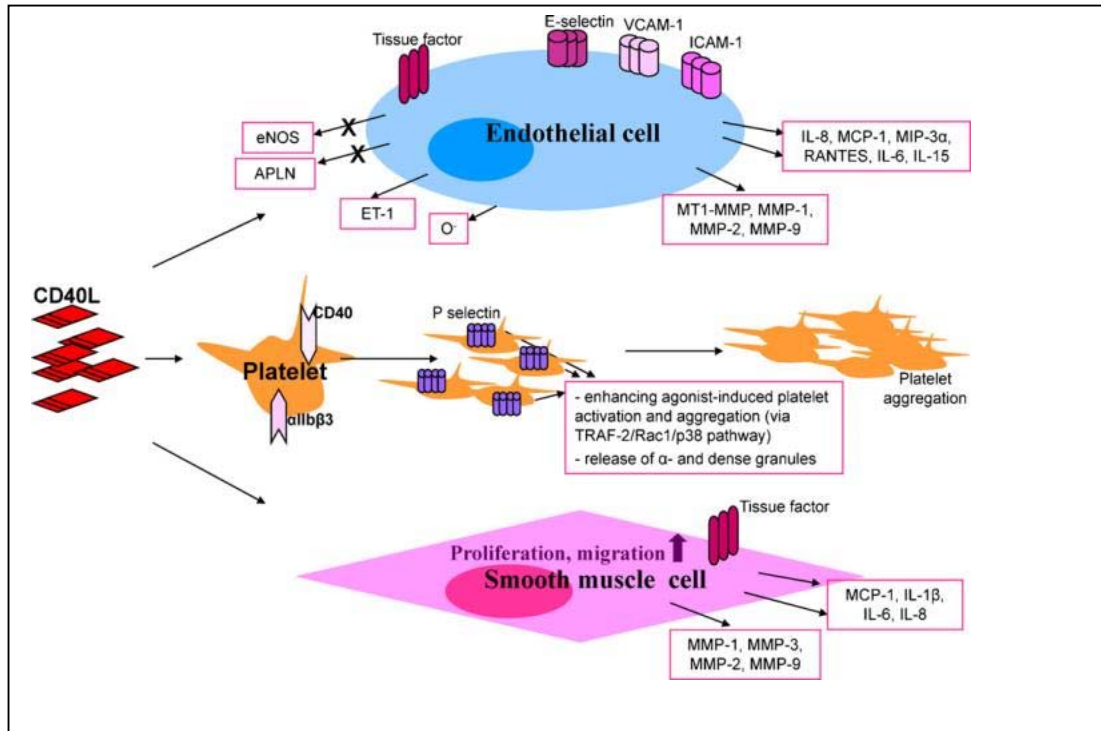


Figure 23: Rôle de l'interaction du CD154 dans les CEs, les SMCs et les plaquettes. Le CD154 induit de nombreux rôles biologiques dans les cellules vasculaires. Les CE stimulées par le CD154 ont montré une expression accrue de leurs molécules d'adhésion E-sélectine, VCAM-1 et ICAM-1) une production accrue de chimiokines pro-inflammatoires (IL-8, MCP-1, MIP -3, RANTES, IL-6 et IL-15), des métalloprotéinases (MT1-MMP, MMP-1, MMP-2 et MMP-9) les facteurs vasoactifs (endothéline-1 (ET-1), et une diminution des facteurs de protection cardio-vasculaire (apéline (APLN), oxyde nitrique synthétique endothéliale (eNOS)). Dans les plaquettes, le CD154 induit la propagation, l'activation des plaquettes, l'expression de la P-sélectine et l'activation plaquettaire. Dans les SMC, le CD154 induit la prolifération cellulaire, la migration et la production de chimiokines proinflammatoires (MCP-1, IL-1, IL-6 et IL-8) et de métalloprotéinases (MMP-1, MMP-3, MMP-2 et MMP-9) [187].

1.4.1.2 Rôle de l'interaction CD40/CD154 dans les maladies auto-immunes

L'auto-immunité résulte d'une défaillance dans le maintien de la tolérance au soi. Etant donné le rôle central que joue l'interaction du CD154 dans les différentes réponses immunitaires, son implication a été largement démontrée en particulier dans l'arthrite rhumatoïde et le lupus érythémateux disséminé. Etant donné les nombreuses fonctions biologiques qu'implique l'interaction du CD154 avec son principal récepteur le CD40, la majorité des travaux se sont penchés sur le rôle de cet axe dans l'arthrite rhumatoïde et le lupus érythémateux disséminé. Malgré la diversité d'expression du CD154 et ses nouveaux récepteurs les intégrines α IIb β 3, α 5 β 1, α M β 2 et α v β 3 sur de nombreux types cellulaires ainsi l'importance de leurs rôles biologiques dans les réponses immunitaires, il existe peu de travaux sur leurs implications dans les maladies auto-immunes. Cependant, il a été démontré que le CD154 contribue au développement de ces dernières par plusieurs façons [19]. En effet, lors de la sélection négative des lymphocytes T qui a lieu dans le thymus, il a été rapporté que l'activation du CD40 pouvait compromettre cette sélection en permettant à des clones de lymphocytes T auto-réactifs de s'échapper des mécanismes de délétions cellulaires. De plus, au niveau des organes lymphoïdes secondaires, l'interaction du CD154 des cellules T auto-réactives avec le CD40 des lymphocytes B et des cellules dendritique favorise la génération d'auto anticorps circulants ainsi que des cytokines contribuant au développement des maladies auto-immunes. Enfin, au niveau des organes cibles, l'interaction CD40/CD154, stimule la production de cytokines inflammatoires impliquées dans la destruction du tissu **(figure 24)** [19, 275, 276].

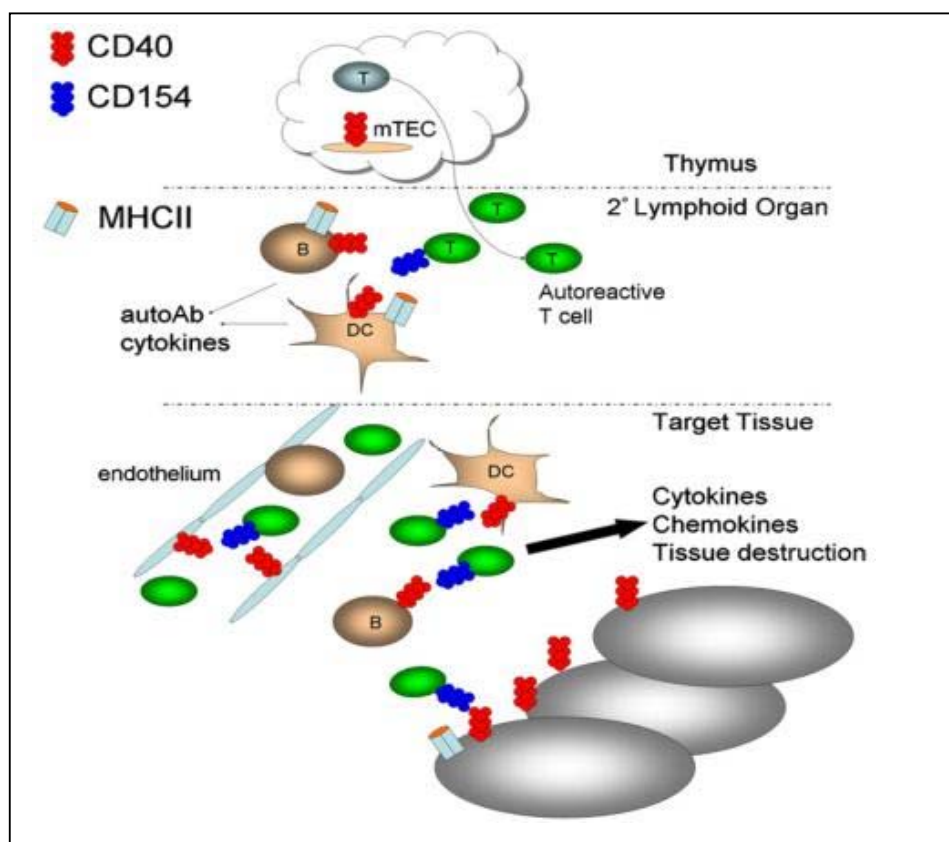


Figure 24: Mécanismes d'action potentiels par lesquels le complexe CD40/CD154 contribue aux maladies auto-immunes. Le CD154 contribue aux maladies auto-immunes de plusieurs façons. 1) Permettrait à certaines cellules T auto réactives d'échapper à la sélection négative au cours de la sélection des lymphocytes T au niveau du thymus, 2) Au niveau des organes lymphoïdes secondaires où les cellules T interagissent avec les lymphocytes B et/ou les cellules dendritiques. 3) Au niveau des organes cibles où la signalisation induite par la production de cytokines inflammatoires impliquées dans la destruction des tissus cible [19].

1.4.1.3 Rôle de l'interaction CD40/CD154 dans l'arthrite rhumatoïde

L'arthrite rhumatoïde (AR) est une maladie inflammatoire chronique qui touche environ 1% des adultes et induit la destruction du cartilage [19]. Elle est caractérisée par une infiltration accrue des cellules immunitaires dans les articulations, qui provoque la libération de cytokines proinflammatoires telles que le $\text{TNF-}\alpha$ et l'IL-1

ainsi que la synthèse de métalloprotéinases. L'infiltration des leucocytes et des cellules synoviales conduit à la destruction du tissu cartilagineux et à la dégradation des os entraînant ainsi la perte des mouvements articulaires [277].

Plusieurs travaux ont démontré l'implication du CD154 et de son récepteur le CD40 dans la pathogenèse de l'AR. En effet, au cours de cette pathologie, le CD154 est surexprimé à la surface des lymphocytes T synoviaux des patients en comparaison avec les contrôles. Ce dernier augmente la production d'immunoglobulines par les lymphocytes B et la sécrétion de l'IL-12 par les cellules dendritiques synoviales et les macrophages [278, 279]. La surexpression du CD154 à la surface des cellules T induit également l'expression des molécules de co-stimulation, CD80 et CD86 sur les APCs, favorisant ainsi l'activation des cellules T. Le CD154 contribue également à la pathogenèse de l'AR en induisant l'expression et l'activation de MMP (MMP-1, MMP-9 et MMP-3), qui sont bien connus pour conduire à la dégradation des protéines de la matrice extracellulaire [280, 51]. L'ARNm ainsi que la protéine du CD154 sont également régulés positivement chez ces patients [281]. Dans un modèle de l'arthrite chez la souris (collagen induced arthritis (CIA)), le complexe CD40/CD154 est impliqué dans les phases inflammatoires initiales de l'arthrite, puisque l'administration d'un anticorps monoclonal anti-CD154 avant l'induction de l'arthrite prévient ou améliore la maladie, alors que l'administration de ce même traitement une fois l'arthrite débutée, ne semble pas guérir les souris ayant déjà développées le CIA [282]. Le CD40 est également impliqué dans l'initiation de l'AR. En effet, le CD40 est surexprimé à la surface des fibroblastes synoviaux, il induit le relâchement des chimiokines et des cytokines telles que: l'IL-8, l'IL-15, l'IL-17, le TNF et le MCP-1 augmentant ainsi les symptômes liés à l'AR [283, 284]. D'autres travaux ont rapporté que l'activation du CD40 sur ses cellules, favorise l'expression membranaire du ligand de RANK, une molécule impliquée dans l'activation des ostéoclastes et dans la résorption de l'os [285]. La liaison du CD40 sur des macrophages synoviaux CD68⁺ augmente également l'expression du: CD154, CD106, IL-6, VEGF (endothelial cell growth factor) (VEGF), IL-8 et RANTES (Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed, and Secreted) [286, 287]. Il a été démontré que la liaison du CD40 à une protéine sCD154

recombinante, sur des cellules synoviales fraîchement isolées induit la production de $\text{TNF-}\alpha$ et d' $\text{IL-1}\beta$ augmentant ainsi la pathogenèse de l'AR [279].

Par ailleurs, l'interaction CD40/CD154 augmente le recrutement et l'infiltration des cellules immunitaires sur les sites d'inflammation en augmentant l'expression des molécules d'adhésion telles que: la sélectine E, VCAM-1 et ICAM-1 sur les cellules fibroblastiques (**figure 25**) [288, 215].

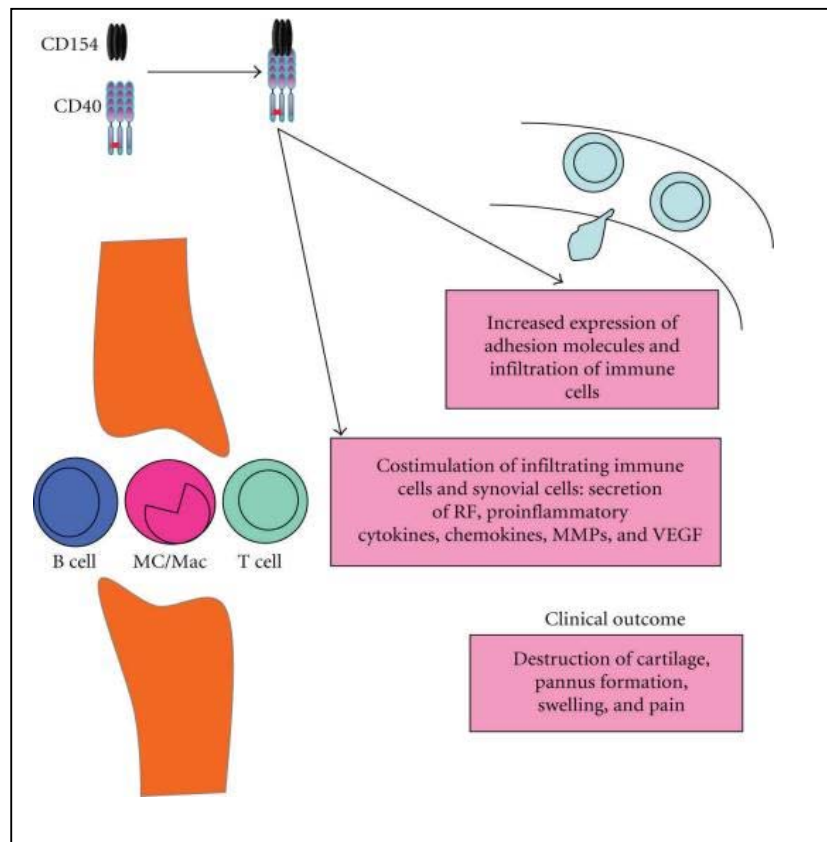


Figure 25: Rôle biologique du CD154 dans l'AR. Le CD154 contribue à la pathogenèse de l'AR en stimulant l'expression de molécules d'adhérences, production de RF, libération de médiateurs inflammatoires, y compris cytokines, chimiokines, MMP et autres [215].

1.4.1.4 Rôle de l'interaction CD40/CD154 dans le lupus érythémateux disséminé

Le lupus érythémateux disséminé (SLE) est une maladie auto-immune systémique qui affecte les organes comme: la peau, les articulations, les poumons, le cœur, le cerveau et les reins [19]. La SLE est caractérisé par une hyperréactivité lymphocytaire T et B et la production d'auto-anticorps en particulier d'anticorps antinucléaires et d'anticorps anti-ADN [289].

Il a été rapporté que chez les patients souffrants de SEL, le mCD154 est surexprimé sur les cellules T CD4⁺ et T CD8⁺. Les lymphocytes B et les monocytes de ces patients expriment également de façon étonnante des niveaux élevés du CD154 [290, 291]. L'expression du CD154 sur les cellules B est également observée chez des souris BXSB prédisposées au lupus [55]. Il a été démontré que des souris génétiquement modifiées afin d'exprimer des niveaux élevés de CD154 au niveau des cellules B, produisent spontanément des auto-anticorps tels que les anticorps anti-ADN et développent une forme similaire au lupus avec l'âge [292].

Il a été rapporté que chez patients atteints de SEL, l'expression du CD154 sur les cellules T activées améliore l'expression de la molécule de co-stimulation CD86 qui joue un rôle important dans la production d'anticorps par les cellules B [293]. D'autres part, le CD154 contribue à la pathogenèse du SEL en induisant la production de diverses cytokines et chimiokines dans les cellules endothéliales et tubulaires rénales, augmentant ainsi les réponses inflammatoires locales [294, 295]. La sécrétion d'auto-anticorps par les cellules B peut aussi être due à la présence de niveaux élevés du sCD154 biologiquement actif dans le sérum qui induit l'activation de ces dernières (**Figure 26**) [215].

Le sCD154 joue aussi un rôle très important dans pathogenèse du SEL. En effet, une corrélation entre les concentrations du sCD154 et les niveaux d'auto-anticorps anti-ADN double brin (ADNdb) et la sévérité de la maladie ont été rapporté chez les patients [290, 293]. Ce sCD154 est biologiquement actif est capable d'activer les lymphocytes B des patients et induire la sécrétion d'auto-anticorps [290, 293].

L'administration d'un anticorps anti-CD154 dans un modèle expérimental du lupus érythémateux disséminé chez la souris, diminue significativement les titres d'anticorps anti-ADN et améliore les complications pathologiques associées à la maladie [299]. Il a identifié chez les patients atteints de SEL une association entre certains polymorphismes génétiques et l'incidence de la maladie. Le polymorphisme nucléotidique du CD40 le rs11086998 G, est surreprésenté dans les populations mexicaines et sud-américaines atteintes du lupus. Ce polymorphisme du CD40 résulte de la substitution d'une proline par une alanine à l'acide aminé 227 et augmente sévèrement les symptômes liés à la SLE [300].

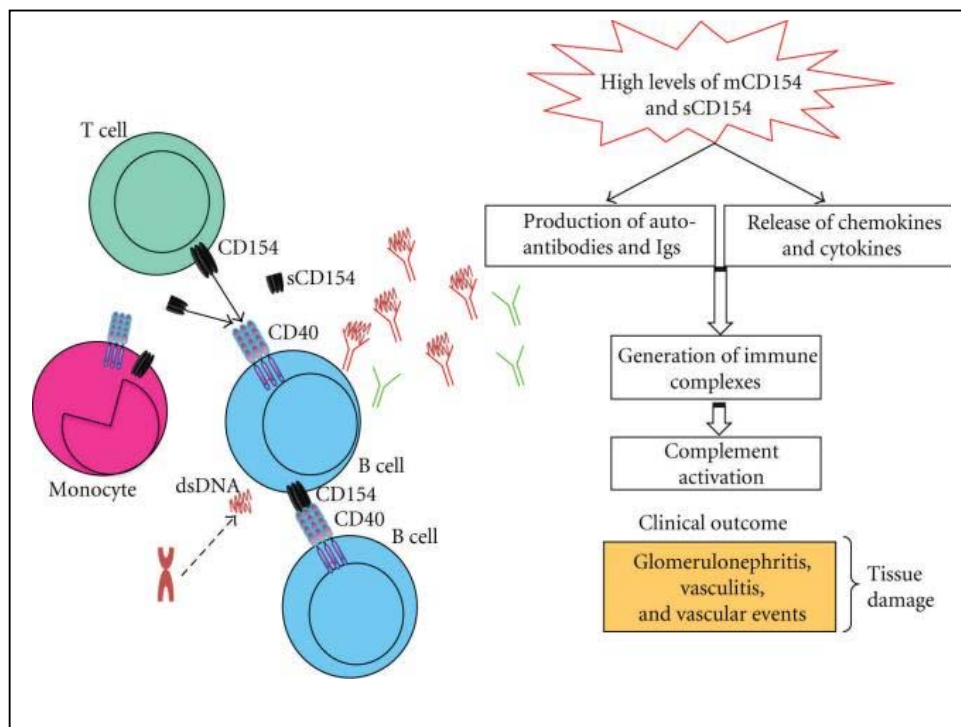


Figure 26: Rôle du CD154 dans le SLE. Des taux élevés de mCD154 et sCD154 activent diverses cellules immunitaires dans le SLE, y compris les cellules T, les cellules B et les monocytes. L'interaction du CD154 dans ces cellules induit la libération de médiateurs inflammatoires et la production d'autoanticorps conduisant à la génération de complexes immuns et à l'activation du système du complément induisant ainsi de nombreuses manifestations cliniques chez les patients atteints de SLE [215].

1.4.1.5 Rôle dans le cancer

Le CD154 joue un rôle important dans le développement et la progression du cancer [301, 302, 303]. Il a été rapporté une surexpression du CD154 sur les cellules tumorales et une production accrue du soluble CD154 a été retrouvée dans le sérum des patients [304, 305, 306, 307]. De plus, il existe une corrélation positive entre les niveaux d'expression du CD154 sur certaines cellules tumorales et le degré d'agressivité et d'évolution de ces cellules [303].

Cependant, le CD154 peut également avoir un effet anti-tumoral [308, 309]. L'engagement du CD154 sur plusieurs lignées tumorales induit un signal pro-apoptotique causant la mort cellulaire. Les voies signalétiques pro-apoptotiques déclenchées suite à la liaison du CD40 sur les cellules tumorales incluent principalement l'activation des protéines Bax, Bak et Bik, ainsi qu'une sensibilité accrue aux effets apoptotiques du FasL et du TNF [310].

Par ailleurs, l'interaction du CD154 sur les lymphocytes TCD4⁺ avec le CD40 des cellules dendritique induit la production de cytokines proinflammatoires telles que l'IL-12 et l'INF γ et de molécules d'adhésions qui vont sensibiliser les cellules T CD8⁺ cytotoxiques ainsi que les Natural Killers (NK) qui agissent directement sur les cellules tumorales afin d'induire leur mort cellulaire par la sécrétion de la perforine et la granulysine [311, 312].

1.4.2 Rôle de l'interaction CD154/intégrines dans les pathologies

La plupart des fonctions biologiques du CD154 ont été attribuées à son interaction avec son principal récepteur, le CD40. Cependant, des études utilisant des souris CD154^{-/-} et CD40^{-/-} ont suggéré que le CD154 peut interagir avec d'autres récepteurs. En effet, André et al ont montré que le sCD40L interagit avec l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta 3$, déclenchant ainsi l'activation et la diffusion des plaquettes. Ils ont également démontré que les souris CD40^{-/-} présentent une augmentation du temps de saignement et une réduction du thrombus [60, 244]. Par ailleurs, il a été démontré que l'activation de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta 3$ par le CD154, induit l'adhérence des plaquettes et augmente le temps d'exposition du CD154 à la surface plaquettaire renforçant ainsi l'interaction des plaquettes avec les cellules CD40⁺ [195]. D'autres travaux ont également rapporté le rôle de l'interaction du CD154 avec l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans l'activation plaquettaire. En effet, l'utilisation d'un anticorps bloquant contre $\alpha 5\beta 1$, empêche l'activation plaquettaire induite par le CD154 et réduit l'expression de la P-sélectine et du PAC-1 à la surface des plaquettes humaines [196]. Dans l'athérosclérose, il a été rapporté que l'inhibition de l' $\alpha 5\beta 1$ par un anticorps spécifique, diminue la production des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , TNF- α et l'INF- γ) [222].

L'interaction CD154/ $\alpha 5\beta 1$ a également été retrouvée impliquée dans l'asthme allergique. En effet, il a été démontré que l'interaction des cellules T avec les fibroblastes bronchiques augmentait la production de la cytokine pro-inflammatoire IL-6. Cet effet était significativement plus élevé chez les fibroblastes des patients asthmatiques. L'utilisation d'un anticorps bloquant l'interaction CD154/ $\alpha 5\beta 1$ a montré une inhibition significative de l'expression de l'IL-6 chez ces patients [243].

Les intégrines sont également des molécules très importantes dans le développement des cancers. Les intégrines $\alpha 5\beta 1$ et $\alpha\text{IIb}\beta 3$ reconnaissent le motif RGD du tripeptide dans les protéines de la MEC. Ces membres constituent la plus importante sous-famille de récepteurs d'intégrines essentielles au cancer et à leurs métastases [313]. Ces derniers jouent un rôle clé dans l'adhérence, la migration, la prolifération, la

différenciation et la survie des cellules, tant dans les cellules normales que dans les cellules tumorales [314, 315] et font des intégrines la cible de nombreuses stratégies anti-angiogéniques pour le traitement des tumeurs malignes chez l'homme [313, 315].

Il a été rapporté qu'une forte expression de la sous unité $\alpha 5$ dans les biopsies cliniques est associée à un risque accru de mortalité [313]. Par ailleurs, les cellules cancéreuses du sein présentant des taux élevés de $\alpha 5\beta 1$ ont un caractère invasif 3 fois plus élevé que par rapport aux cellules présentant une faible expression de $\alpha 5\beta 1$, de plus, $\alpha 5\beta 1$ est impliquée dans l'angiogenèse des cellules tumorales par la sécrétion de molécules pro-angiogéniques, telles que le facteur de croissance des fibroblastes-2 (FGF2) [313, 318, 319, 320].

2. Hypothèse et objectifs

Le CD154 est un régulateur important des réponses immunitaires. L'interaction de ce dernier avec son principal récepteur, le CD40 a largement été étudiée et incriminée dans de plusieurs pathologies. Cependant, des études utilisant des souris CD154-/- et CD40-/- ont suggéré que le CD154 pourrait également se lier à un ou plusieurs autres récepteurs et induire une réponse inflammatoire. La découverte des nouveaux récepteurs du CD154, les intégrines α IIb β 3, α M β 2, α v β 3 et α 5 β 1, impliquées dans la survie et la prolifération cellulaire pose davantage de questions quant aux rôles de leurs interactions avec le CD154. Bien que quelques travaux aient montré l'importance de cette dernière, des études pour consolider et améliorer notre compréhension de l'implication de cette association dans les réponses immunitaires sont nécessaires. Les cellules T sont au cœur des pathologies inflammatoires et autoimmunes, ils expriment lors de ces dernières des niveaux élevés d'intégrines β 1. Étant donné le rôle attribué aux intégrines et en particulier aux intégrines β 1 dans l'inhibition des événements apoptotiques dans les cellules T, nous étions très intéressés d'étudier le rôle de l'interaction CD154/ α 5 β 1 dans la promotion de la survie des cellules T.

Hypothèse: L'interaction du CD154 avec l'intégrine α 5 β 1 favorise la survie et la persistance des cellules T lors des maladies inflammatoires et auto-immunes.

Objectif: les objectifs de ce projet étaient de:

1. Identifier les voies de signalisation induites suite à l'engagement du CD154 avec l'intégrine α 5 β 1 sur les lignées cellulaires T.
2. Etudier le rôle de l'interaction du sCD154 avec α 5 β 1 dans l'inhibition de la mort induite par Fas dans les lignées cellulaires T, et identifier les mécanismes intracellulaires impliqués.
3. Etudier le rôle de l'interaction du sCD154/ α 5 β 1 dans l'inhibition de la mort induite par les autres récepteurs de mort TRAIL et TNF sur les lignées cellulaires T.
4. Etudier le rôle de l'interaction sCD154/ α 5 β 1 dans la survie des cellules humaines T CD3⁺ ainsi que les sous populations T CD4⁺ et T CD8⁺.

5. Etudier la capacité du mCD154 à interagir avec l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et inhiber la réponse de mort dans les cellules T.

3. L'interaction du CD154 avec l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ inhibe la mort induite par Fas dans les cellules T (Article # 1)

Article publié dans PlosOne en 2016

3.1 Mise en contexte

Le CD154 joue un rôle crucial dans la réponse immunitaire. Son interaction avec son principal récepteur le CD40, s'est avérée jouer un rôle majeur dans la pathogenèse de plusieurs maladies auto-immunes. Récemment, trois autres récepteurs $\alpha\text{IIb}\beta 3$, $\alpha\text{M}\beta 2$ et $\alpha 5\beta 1$ appartenant à la famille des intégrines ont été identifiés comme des nouveaux récepteurs du CD154. L'interaction avec l' $\alpha 5\beta 1$ a été démontrée dans notre laboratoire, cependant, le rôle biologique de son interaction avec le CD154 reste peu étudié. Les lymphocytes T sont au centre de la pathogenèse des maladies auto-immunes. Ces derniers expriment, lors de celles-ci, des quantités aberrantes d'intégrines $\beta 1$. Par ailleurs, plusieurs travaux ont démontré que les intégrines, et en particulier les intégrines $\beta 1$, suite à leurs interactions avec leurs ligands naturels, inhibent les événements apoptotiques dans les cellules T de nature normale ou maligne. Dans cette étude nous avons étudié le rôle biologique de l'interaction du CD154 avec l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans l'apoptose des cellules T.

3.2 Contribution des co-auteurs

Bachsais Meriem: planification et réalisation des expériences (figure 1A, 2, 3 4, 5, 6), analyse des données, correction de l'article.

Nadim Naddaf: planification et réalisation des expériences expériences (figure 1B, 2, 3, 4 et 7, 8), analyse des données, correction de l'article.

Daniel Yacoub: analyse des données, rédaction de l'article.

Suzanne Salti: réalisation des expériences et analyse des données.

Nada Alaaeddine: analyse des données.

Ghada S. Hassan: analyse des données, rédaction de l'article.

Fawzi Aoudjit: planification des expériences, analyse des résultats, rédaction de l'article.

Walid Mourad: planification des expériences, analyse des résultats, rédaction de l'article.

3.3 Résumé

Le CD154 est un régulateur essentiel de la réponse immunitaire. Il est généralement associé aux maladies inflammatoires chroniques, auto-immunes et aux cancers. En plus de son récepteur classique le CD40, le CD154 est capable de se lier à d'autres récepteurs, appartenant à la famille des intégrines telles que : $\alpha\text{IIb}\beta 3$, $\alpha\text{M}\beta 2$ et $\alpha 5\beta 1$. Étant donné le rôle attribué aux intégrines, et en particulier aux intégrines $\beta 1$, dans l'inhibition des événements apoptotiques dans les cellules T normales et malignes, nous étions très intéressés par l'étude du rôle de l'interaction CD154 / $\alpha 5\beta 1$ dans la promotion de la survie des cellules T malignes contribuant en tant que telles au développement et / ou à la propagation de la tumeur. Afin d'appuyer notre hypothèse, nous montrons d'abord que le sCD154 se lie à la lignée cellulaire T Jurkat E6.1, de manière dépendante de $\alpha 5\beta 1$. Cette liaison induit l'activation des protéines clés de survie, notamment les protéines kinases p38 et ERK1/2 (MAPK), la phosphoinositide 3 kinase (PI-3K) et l'Akt. De manière intéressante, le sCD154 inhibe de manière significative l'apoptose médiée par Fas dans les lignées cellulaires T Jurkat E6.1 et HUT78, une caractéristique importante de la survie des cellules T au cours de la progression des tumeurs malignes. Ces effets anti-apoptotiques étaient principalement médiés par l'activation de la voie PI-3K / Akt, mais également les voies MAPK p38 et ERK1 / 2. Nos données ont également démontré que l'inhibition de la réponse de mort cellulaire induite par Fas, était due à l'inhibition du clivage de la caspase-8. L'ensemble de nos résultats mettent en évidence l'impact de l'interaction CD154 / $\alpha 5\beta 1$ sur la fonction / survie des lymphocytes T et identifient de nouvelles cibles pour le traitement des troubles malins, en particulier ceux qui ont pour origine les lymphocytes T.

The interaction of CD154 with the $\alpha 5\beta 1$ integrin inhibits Fas-induced T cell death

Meriem Bachsais^{1*}, Nadim Naddaf ^{1*}, Daniel Yacoub¹, Suzanne Salti¹, Nada Alaaeddine², Fawzi Aoudjit³, Ghada S. Hassan¹, and Walid Mourad^{1†}

¹Laboratoire d'Immunologie Cellulaire et Moléculaire, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, 900 rue Saint-Denis, Tour Viger, Room 10-482, Montréal, Qc, Canada, H2X 0A9, ²Department of Pathology, 11-5076, Faculty of Medicine, St Joseph University, Beirut, Lebanon, ³ Centre de recherche en immunologie et rhumatologie, CHUL, 2705, Boul Laurier, QC, Canada

PlosOne 2016

* These authors contributed equally to this work.

† To whom correspondence should be addressed: Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CR-CHUM), 900 rue Saint-Denis, Tour Viger, Room 10-482, Montréal, Qc, Canada, H2X 0A9; Tel: 514-890-8000 Ext: 35287; Fax: 514-412-7314; E-mail: mw.mourad@umontreal.ca

Running Title: CD154 and malignant T cell survival.

Abstract

CD154, a critical regulator of the immune response is usually associated with chronic inflammatory, autoimmune diseases as well as malignant disorders. In addition to its classical receptor CD40, CD154 is capable of binding other receptors, members of the integrin family, the α IIb β 3, α M β 2 and α 5 β 1. Given the role attributed to integrins and particularly the β 1 integrins in inhibiting apoptotic events in normal as well as malignant T cells, we were highly interested in investigating the role of the CD154/ α 5 β 1 interaction in promoting survival of malignant T cells contributing as such to tumor development and/or propagation. To support our hypothesis, we first show that soluble CD154 binds to the T-cell acute lymphoblastic leukemia cell line, Jurkat E6.1 in a α 5 β 1-dependent manner. Binding of soluble CD154 to α 5 β 1 integrin of Jurkat cells leads to the activation of key survival proteins, including the p38 and ERK1/2 mitogen-activated protein kinases (MAPKs), phosphoinositide 3 kinase (PI-3K), and Akt. Interestingly, soluble CD154 significantly inhibits Fas-mediated apoptosis in T cell leukemia-lymphoma cell lines, Jurkat E6.1 and HUT78 cells, an important hallmark of T cell survival during malignancy progression. These anti-apoptotic effects were mainly mediated by the activation of the PI-3K/Akt pathway but also involved the p38 and the ERK1/2 MAPKs cascades. Our data also demonstrated that the CD154-triggered inhibition of the Fas-mediated cell death response was dependent on a suppression of caspase-8 cleavage, but independent of *de novo* protein synthesis or alterations in Fas expression on cell surface. Together, our results highlight the impact of the CD154/ α 5 β 1 interaction in T cell function/survival and identify novel targets for the treatment of malignant disorders, particularly of T cell origin.

Introduction

CD154, also known as CD40 ligand or gp-39, is a 33 kDa type II transmembrane protein that belongs to the tumor necrosis factor (TNF) superfamily. Although it was initially found on activated CD4-positive T cells, it is now evident that CD154 is expressed on various cells of the immune system [1,2]. The interaction of CD154 with its classical receptor on B cells, CD40, a member of the TNF receptor (TNFR) family, is of critical importance for immunoglobulin isotype switching during humoral immune response [3]. In addition, this axis also plays a predominant role in cell-mediated immunity, through the up-regulation of adhesion and co-stimulatory molecules, and the production of pro-inflammatory cytokines, chemokines, growth factors, matrix metalloproteinases and procoagulants [4,5,6,7]. Because of its implication in the above described responses, CD154 has been linked to multiple inflammatory conditions, to anti-tumorigenic immune functions but also to survival/proliferation of cancer cells [8,9,10,11,12]. Indeed, circulating levels of soluble CD154 (sCD154), which originate from the proteolytic cleavage of membrane-bound CD154 at the surface of activated T cells and platelets, have now emerged as strong indicators of immune activity in inflammatory diseases [13,14,15,16] and of prognosis level in some types of cancers [17,18,19]

Although CD40 represents the classical CD154 receptor, additional binding partners of potential importance in CD154-mediated inflammatory reactions have been described, namely the α Ib β 3 [20], α M β 2 [21] and α 5 β 1 integrins [22]. Each of these receptors interacts with CD154 in a specific manner. While only inactive α 5 β 1 [22] and active α M β 2 [21] bind to CD154, α Ib β 3 [20,23] in both inactive and active forms may bind to CD154. Indeed, distinct residues of CD154 are involved in its binding to CD40, α 5 β 1, and α Ib β 3, while residues required for α M β 2 binding are shared by CD40 [24]. The interaction of CD154 with α Ib β 3 is required for thrombus stabilization [20], while its interaction with α M β 2 may be involved in leukocyte accumulation and neointimal formation during atherogenesis [21]. With respect to the α 5 β 1/CD154 interaction, we reported that binding of CD154 to α 5 β 1 of human monocytic cells induces several signaling events that may modulate cell

function [22]. However, the physiological relevance of this interaction remains uncharacterized.

Integrins and particularly the $\beta 1$ integrins have been shown to inhibit apoptotic events in T cells of normal or malignant nature. Indeed, ligation of $\beta 1$ integrins on surface of T cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) cell lines or primary T cells was shown to reduce apoptosis of these cells in response to cell activation [25], to cell starvation [26] or to Fas stimulation[27,28]. Such apoptosis control induced by the engagement of $\beta 1$ integrins in T-ALL cell lines was shown to involve activation of several signaling cascades such as the Protein-Phosphatase-2A, the MAPK ERK, the focal adhesion kinase, the MAPK p38 leading to reduced caspase activation and/or sustained Bcl-2 anti-apoptotic protein expression [26,27,28]. Interestingly, adhesion-mediated signaling via $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha 2\beta 1$ protected malignant T cells from doxorubicin-induced cell death response conveying as such resistance to chemotherapy [29,30].

This led us to hypothesize that the interaction of $\alpha 5\beta 1$ integrin with its novel ligand CD154 may represent an important axis in T cell crosstalks and cell resistance to apoptosis, hallmark of T cell malignancies. Here, we show that soluble CD154 binds to the human T-ALL cell line, Jurkat E6.1 in an $\alpha 5\beta 1$ -dependent manner. This is associated with the activation of key survival signaling pathways, such as the MAPKs (p38 and ERK1/2) and phosphoinositide 3 kinase (PI-3K)/Akt cascades. More importantly, data presented herein, indicate that CD154 is capable of significantly protecting T-cell leukemia or lymphoma cell lines from Fas-mediated death, through activation mainly of the PI-3k/Akt pathway but also of the p38 and ERK1/2 MAPK cascades as well as via the inhibition of caspase-8 cleavage. This study adds insights into the role of the CD154/ $\alpha 5\beta 1$ interaction in T cell function and its resistance to apoptosis-inducing events in many diseases in general and hematopoietic malignancies in particular.

Results

Soluble CD154 binds to Jurkat E6.1 T cells in $\alpha 5\beta 1$ -specific manner

Malignant T cells such as T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) cell lines express the $\alpha 5\beta 1$ integrin [31]. We aim here at investigating the $\alpha 5\beta 1$ -dependent binding of CD154 to these cells, using the human T-ALL cell line, Jurkat E6.1 as a model. For this purpose, we have first analyzed the expression of CD154 receptors, CD40, $\alpha M\beta 2$, $\alpha 5\beta 1$, and $\alpha IIb\beta 3$ on the surface of Jurkat E6.1 cells, by flow cytometry. The Burkitt's lymphoma B cell line, BJAB was used as a control as it is known to be negative for $\alpha 5\beta 1$ expression [24,32]. Our data show that Jurkat E6.1 T cells express only $\alpha 5\beta 1$, while BJAB cells express only the CD40 receptor (Fig. 1A). It is worth mentioning here that CD40 expression was assessed using two anti-CD40 antibodies (Abs), the clone G28.5 (Fig 1A) and the clone 5C3 (data not shown), both of which yielded comparable results. No detectable $\alpha IIb\beta 3$, known to be expressed specifically in platelets, or $\alpha M\beta 2$, known to be expressed on monocytes, dendritic cells, and polymorphonuclear cells, was observed in both cell types (data not shown). We then analyzed the binding of sCD154 to these cells using sCD154 labeled with Alexa 488 (sCD154-Alexa). As shown in Fig 1B, both cell lines, Jurkat E6.1 and BJAB cells, exhibited significant binding of sCD154-Alexa. Pre-incubation with 10 fold excess of uncoupled sCD154 strongly reduced and abolished sCD154-Alexa binding to Jurkat E6.1 and BJAB cells respectively, confirming the specificity of our experimental approach. More importantly, co-incubation of sCD154-Alexa with soluble $\alpha 5\beta 1$ completely reversed sCD154 binding to Jurkat E6.1 cells, but not to BJAB cells. Inversely, co-incubation of sCD154-Alexa with soluble CD40 had no effect on sCD154 binding to Jurkat E6.1 cells, while it entirely reversed its binding to BJAB cells. Taken together, these data indicate that sCD154 binds to Jurkat E6.1 T cells in an $\alpha 5\beta 1$ -dependent manner.

Binding of sCD154 to T cells induces intracellular signaling

In order to demonstrate the biological significance of the interaction between CD154 and the $\alpha 5\beta 1$ integrin on T cells, and having confirmed above that $\alpha 5\beta 1$ is

the only CD154 receptor expressed in Jurkat E6.1, cells were stimulated with sCD154 and assessed for intracellular events. Interestingly, binding of sCD154 to T cells was associated with the activation of key survival signaling pathways, such as the MAPKs and PI-3K cascades. Indeed, sCD154 induced a significant time-dependent phosphorylation of p38 and ERK1/2, as well as Akt in these cells (Fig 2). In addition, ligation of $\alpha 5\beta 1$ with the agonistic anti- $\alpha 5\beta 1$ antibody, clone JBS5 showed similar activation patterns to those obtained with sCD154, suggesting $\alpha 5\beta 1$ specificity.

Soluble CD154 inhibits Fas-induced apoptosis in T-cell leukemia or lymphoma cells

Cell survival and resistance to cell death are fundamental elements of the pathophysiology of malignant diseases [33]. In search of the physiological outcome of the CD154/ $\alpha 5\beta 1$ interaction in the function of malignant T cells, and based on earlier observations showing that binding of collagen, an extracellular matrix protein, to some members of the $\beta 1$ integrin inhibits Fas-induced cell death [27], we evaluated the impact of sCD154 on Fas-induced apoptosis in T-ALL cell lines. For this purpose, Jurkat E6.1 cells were treated with different concentrations of anti-Fas CH-11 mAb and assessed for their cell death response. As expected, treatment with anti-Fas CH-11 mAb induced a significant and concentration-dependent apoptotic effect in Jurkat E6.1 cells (Fig 3A). Interestingly, pre-incubation of cells with sCD154 inhibited Fas-mediated T cell death in a dose-dependent manner (Fig 3B).

To further confirm the specificity of the $\alpha 5\beta 1$ integrin as the CD154 receptor in play in the resistance of T cells to Fas-induced death, we pre-incubated Jurkat E6.1 cells with different antibodies directed against $\alpha 5\beta 1$, namely clones JBS5, 3S3, JB1A and B3B11, and then treated these cells with anti-Fas CH-11 mAb and evaluated their cell death as above. All anti- $\alpha 5\beta 1$ Abs were capable of inhibiting the Fas-mediated T cell death with the B3B11 clone exhibiting the highest effect (Fig 4A). Indeed, Fig 4B shows the B3B11-concentration-dependent inhibition of the Fas-mediated apoptosis in Jurkat E6.1 cells.

In order to assess if the CD154-mediated inhibition of Fas-induced cell death is specific to Jurkat cells, or could be also observed in other malignant T cells, we tested this effect of CD154 on Fas-stimulated HUT78 cells, a neoplastic T cell line derived from Sezary syndrome T cell lymphoma [34]. Our data show that HUT78 cells express important levels $\alpha 5\beta 1$ integrin and Fas on their cell surface with no detectable expression of CD40 and exhibit significant binding to sCD154 (Fig 5A). To assess their sensitivity to apoptotic events, HUT78 cells were treated with anti-Fas CH-11 mAb and evaluated for their death response. HUT78 cells, shown to express Fas molecules on cell surface, exhibited significant apoptosis in response to Fas stimulation (Fig 5B). Even though HUT78 cells were less sensitive to Fas-induced cell death than Jurkat cells, their pre-incubation with sCD154 also inhibited this Fas-mediated apoptotic response in a dose-dependent manner (Fig 5B).

Together, these results confirm that signaling events triggered upon the binding of sCD154 to $\alpha 5\beta 1$ of leukemia or lymphoma T cell lines, leads to the inhibition of Fas-induced cell death, a phenomenon that plays a key role in the progression of malignancies, and particularly here of T cell origin.

Intracellular mechanisms implicated in the CD154-mediated survival of malignant T cells

To confirm the importance of various intracellular cascades in the CD154-mediated inhibition of Fas-induced apoptosis, specific targeting using biochemical inhibitors, was employed. Jurkat E6.1 T cells were first treated with different concentrations of the PI-3K inhibitor, Wortmannin, the p38 inhibitor, SB203580, or the ERK1/2 inhibitor, U0126 in order to determine the highest concentration of each inhibitor that do not induce a cell death response by itself (data not shown). Following these dose-response experiments, Jurkat E6.1 T cells were treated with sCD154 in the presence of 0.125 μ M of Wortmannin, 10 μ M of SB203580 or 10 μ M of U0126, then stimulated with Fas and assessed for cell death. As shown in Figs 6A-C, specific inhibition of the PI-3K/Akt cascade entirely prevents CD154-mediated influence over the Fas-induced apoptosis, while inhibition of the p38 or of the ERK1/2 MAPKs reduced without completely abolishing this CD154-mediated effect. It is

worth noting here that another inhibitor of the PI-3K/Akt pathway, the LY294002 also completely abrogated the CD154-mediated survival of Fas-stimulated T cells (data not shown).

Taken together, these results indicate that mainly the PI3K/Akt and to a lesser extent the p38 and ERK1/2 MAPK cascades are mediating the CD154-triggered survival of malignant T cells.

Soluble CD154-mediated T cell survival does not alter Fas expression and is independent of de novo protein synthesis

Many studies have shown that CD40 activation alters Fas expression in both normal and malignant B cells [35,36,37,38]. Hence, it was important to determine next whether the sCD154/ $\alpha 5\beta 1$ interaction affects the level of expression of this critical pro-apoptotic gene. Fig 7A shows that sCD154 protects against cell death through a mechanism that appears independent of Fas membrane expression, given that sCD154 did not alter the level of expression of the receptor on cell surface, assessed by the extent of binding of CH-11 coupled to Alexa488. It is worth noting at this point that since these data are showing that in the presence of an excess sCD154, CH-11 was still capable of binding similarly to its receptor on T cell surface, thus the inhibiting effect of CD154 toward the Fas-mediated cell death response is not due to a competition between CD154 and CH-11 for the Fas-receptor binding. This effect was also independent of *de novo* protein synthesis, as pre-treatment with cycloheximide, an inhibitor of protein biosynthesis, did not reverse sCD154 ability to prevent Fas-mediated T cell death (Fig 7B).

CD154 inhibits Fas-mediated T cell death by blocking caspase-8 cleavage

Caspase-8 cleavage is a critical aspect of Fas-mediated cell death. This ultimately leads to cytochrome c release from the mitochondria and caspase-3 activation [39]. To investigate the role of sCD154 in inhibiting caspase-8 cleavage, two different mAbs against caspase-8 (1C12 mAb for the detection of the full length caspase-8 [57 kDa] as well as cleaved intermediates [p44/p43 and p18 fragments] and 18C8 mAb for the detection of cleaved intermediates only [p44/p43 and p18 fragments])

were used in a Western Blot technique. Fig 8 shows that treatment of Jurkat E6.1 T cells with the pro-apoptotic anti-Fas CH-11 mAb induces caspase-8 cleavage, as compared to non-stimulated cells. However, pre-incubation of cells with sCD154 prior to anti-Fas CH-11 mAb treatment, entirely prevented Fas-mediated caspase-8 cleavage. These data outline the mechanism of CD154-mediated inhibition of apoptosis in T cells and highlight the physiological relevance of the CD154/ $\alpha 5\beta 1$ axis in these cells as a promoter of cell survival and resistance to apoptosis.

Discussion

Multiple lines of evidence now support the implication of CD154 in the development of chronic inflammatory and autoimmune disorders [8,40], as well as malignant disorders [11,12]. Even though most CD154-driven pathways have been attributed to its interaction with CD40, additional binding partners have been described namely the integrins α Ib β 3, α M β 2 and α 5 β 1 [20,21,22]. These receptors add complexity to the diverse interplays in which CD154 takes part. In this study, for the first time, we reveal the importance of the CD154/ α 5 β 1 interaction in the function of T lymphocytes of malignant nature. Using T-ALL cell lines, we showed that binding of sCD154 to α 5 β 1 on these cells induces activation of key survival signaling pathways such as the MAPKs (p38 and ERK1/2) and PI3K cascades, in a manner that is independent of integrin conformational change or activation. More importantly, we highlight the pathophysiological importance of this axis in T cell survival and resistance to Fas-mediated cell death through inhibition of caspase-8 cleavage.

Malignant T cells constitutively express many types of integrins including the α 5 β 1 [31]. Given the identification of α 5 β 1 as a novel receptor for CD154, we first assessed the capacity of CD154 to bind to the T-ALL cell line, Jurkat E6.1. Our data demonstrate that sCD154 binds to Jurkat T cells, which are negative for CD40, α M β 2 and α Ib β 3. The α 5 β 1 integrin is however not restricted to T cells, as human monocytic cells [22] and bronchial fibroblasts [41] obtained from asthmatic subjects have been previously shown to interact with CD154 in an α 5 β 1-dependent manner. Hence, CD154/ α 5 β 1 crosstalks may take place in various cells of immune, inflammatory or malignant nature, contributing as such to the development of inflammatory diseases as well as malignancies, particularly here hematopoietic ones.

Since sCD154 binds to T cell lines in an α 5 β 1-restricted manner, it was essential to determine whether this interaction could induce intracellular signaling. As CD40 signaling in B cells induces the activation of specific signaling pathways, including the p38 and ERK1/2 MAPKs [42], leading to B cell differentiation and

survival, our data showed that $\alpha 5\beta 1$ signaling in response to CD154 could also induce activation of these signaling cascades in T cells. In addition to p38 and ERK1/2, we showed that the CD154/ $\alpha 5\beta 1$ interaction leads to Akt activation, another critical pathway of CD154-induced B cell activation and differentiation [42]. In parallel, binding of $\alpha 5\beta 1$ to its classical fibronectin ligand also induces the activation of similar signaling pathways including MAPKs [43,44,45], suggesting that $\alpha 5\beta 1$ signaling in T cells is not specific to CD154 but can be also induced by other ligands. Nevertheless, the ability of sCD154 to induce activation of these signaling pathways in T cells is indicative of a new cellular activation pathway of potential importance in T cell function.

In addition to cell adhesion and migration on the extracellular matrix, integrins are also capable of promoting differentiation and cell growth processes in many cell types of normal or malignant nature [46,47]. Interestingly, one of the $\beta 1$ integrins, the $\alpha 4\beta 1$ was shown to mediate the interaction of myeloma cells and B malignant cells with the bone marrow stroma leading to cell adhesion, migration and/or survival [48,49]. In T-ALL, another $\beta 1$ integrin, the $\alpha 2\beta 1$ by interacting with collagen I, was capable of mediating bone marrow stroma-induced survival of malignant T cells [26]. We have previously reported that collagen I, by interacting with $\beta 1$ integrins on surface of T cell lines or even primary T cells reduced cell death in response to Fas stimulation. In these studies, we have shown that these interactions induced activation of the Protein-Phosphatase-2A and of the downstream MAPK/ERK pathway leading to an abrogated Fas-induced caspase-8 activation [27]. More recently, it was demonstrated that the Jurkat E6.1 T cell line stimulated with collagen I exhibited activation of their MAPK p38 pathway and downregulation of their Fas-induced apoptosis [28]. Such response was shown to be mediated by $\beta 1$ integrins as overexpressing $\beta 1$ integrins in T cells enhanced their phosphorylation of p38 and abrogated Fas-induced apoptosis while Abs directed against $\beta 1$ integrins reversed these responses [28]. Interestingly, our group has also reported that the $\beta 1$ integrin/collagen interaction was responsible for inhibiting doxorubicin-induced apoptosis in a MAPK/ERK-dependent mechanism, promoting as such a chemo-resistant phenotype [30]. Integrin-associated chemo-resistance was

again assessed in another study, whereby the interaction of fibronectin with the $\alpha 5\beta 1$ integrin in a Jurkat derivative cell line (JB4, lacking the $\alpha 4$ expression) decreased cell apoptosis in response to the chemotherapeutic agent, doxorubicin probably by enhancing Akt phosphorylation [29]. Given these data we were highly interested in investigating if the novel interaction of the $\alpha 5\beta 1$ with CD154 could also induce anti-apoptotic and survival signals in malignant T cells using a T-cell leukemia model, Jurkat E6.1 and a T-cell lymphoma one, HUT78. Indeed, and in agreement with the above studies, pre-incubation of these cells with sCD154 completely prevented Fas-mediated T cell death, indicating that CD154 may represent a critical element of T cell persistence and survival during malignant disorders. The CD154/ $\alpha 5\beta 1$ interaction may thus correspond to a fundamental axis in the progression of tumors, particularly those of hematopoietic type. Our results could explain the enhanced levels of sCD154 observed in hematological malignancies such as acute lymphoblastic leukemia, chronic lymphocytic leukemia, mantle cell lymphoma and multiple myeloma [50] whereby sCD154 could be contributing to the pathogenesis of the disease by enhancing the survival of malignant cells in an $\alpha 5\beta 1$ -dependent manner.

Cell survival is tightly regulated by a balance between anti-apoptotic (survival) factors and pro-apoptotic factors and their intracellular signals. As mentioned above, several intracellular mediators including Protein-Phosphatase-2A, ERK and p38 MAPKs, PI-3K and Akt have been shown to regulate cell survival upon ligation of $\beta 1$ integrins with their natural matrix-derived ligands [27,28,29,51]. In agreement with these results, our data also show that engagement of $\alpha 5\beta 1$ integrin with CD154 induces activation of p38 and ERK1/2 MAPKs and Akt, as discussed above. Furthermore, inhibiting p38 or ERK1/2 MAPKs reduced the anti-apoptotic effect of CD154 in T cells while inhibiting PI-3K completely reversed this effect, confirming the involvement of the p38/ERK1/2 MAPKs and more importantly of the PI-3K/Akt cascade as mechanisms regulating the CD154/ $\alpha 5\beta 1$ -mediated survival of malignant T cells. In the same line of evidence, others have demonstrated that the constitutive activation of PI-3K/Akt is associated with the resistance of certain cell types such as rheumatoid arthritis synovial-like synoviocytes to death

signals including Fas ligand, TNF and TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) [52]. As to the apoptotic signals inside the cell, it is well established that caspase activation and in particular caspase-8 cleavage are key signaling elements of Fas-mediated cell death [39]. Caspase-8 indirectly mediates the release of cytochrome c from the mitochondria and the activation of caspase-3, both of which leads to cleavage of cellular components and programmed cell death. Here, we were able to show that sCD154 by interacting with its receptor on T cells, the $\alpha 5\beta 1$ integrin, inhibits Fas-mediated cell death through inhibition of caspase-8 cleavage, a process that appears independent of *de novo* proteins synthesis. Blocking caspase-8 cleavage was also the underlying mechanism by which a collagen/ $\beta 1$ integrin dyad could reduce Fas-mediated apoptosis in T cell lines [27]. Interestingly, our data herein are further establishing a link between activation of PI-3K/Akt pathway and the inhibition of caspase-8 cleavage.

In conclusion, this study adds significant insights into the role of the CD154/ $\alpha 5\beta 1$ interaction in the function of T cells and particularly malignant ones, and shows that this axis promotes T cell survival and resistance to apoptosis. This novel pathway may drive progression of malignant diseases and underlie mechanisms by which malignant cells can escape immune checkpoints or even chemotherapy. Specific inhibition of this dyad may represent a potential therapeutic target in the treatment of T-cell derived malignancies.

Materials and Methods

Reagents and antibodies

Recombinant soluble CD154 (sCD154) and recombinant soluble CD40-Fc were generated as previously described [53,54]. Anti-caspase-8 (clone 1C12 and 18C8), anti-phospho-p38, anti-p38, anti-phospho-ERK1/2, anti-ERK1/2, anti-phospho-AKT and anti-AKT antibodies were all procured from Cell Signaling Technology (Beverly, MA). Anti-CD95 or anti-Fas (clone CH-11, an IgM) and anti-actin (clone C4) antibodies came from Chemicon (Temecula, CA). Anti-CD95 (LOB3/17, an IgG) was purchased from Bio-Rad AbD Serotec Inc. (Raleigh, NC). Anti- α M β 2 antibodies came from BD Biosciences (Mississauga, ON) while anti- α 5 β 1 (clone JBS5) and anti- α IIb β 3 antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). The anti- α 5 β 1 Abs (clones 3S3, JB1A, B3B11) and the soluble α 5 β 1 (s α 5 β 1) were a generous gift from Dr. John A. Wilkins (Manitoba Centre for Proteomics and Rheumatic Diseases, University of Manitoba, Winnipeg, MB). The anti-CD40 mAb (clone 5C3) was purchased from BioLegend (San Diego, CA), while the anti-CD40 antibody (clone G28.5) was obtained from ATCC (Manassas, VA). The Alexa Fluor-488 labeling kit came from Molecular Probes (Eugene, OR), and labeling of sCD154 (sCD154-Alexa488), CH-11 (anti-Fas, CH-11-Alexa488) and Avidin (Avidin-Alexa488) were performed according to the manufacturer's instructions. The PI-3K inhibitors, Wortmannin and LY294002 were purchased from Calbiochem (San Diego, CA). The p38 inhibitor, SB203580, and the ERK1/2 inhibitor, U0126 were also obtained from Calbiochem. The protein biosynthesis inhibitor cycloheximide was from Sigma-Aldrich (Oaskville, ON).

Cell lines

The human Jurkat E6.1 and HUT78 T cell lines (ATCC; Manassas, VA) were maintained at 37°C in RPMI 1640 media supplemented with fetal bovine serum (FBS) (5% in the case of Jurkat cells and 10% in the case of HUT cells) and 1% L-glutamine, penicillin and streptomycin.

Flow cytometry analysis

The cell surface expression of CD40, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha M\beta 2$ and $\alpha IIb\beta 3$ was determined by FACS analysis, as previously described [22]. Briefly, cells were stained with the appropriate control isotype IgGs or respective antibodies (anti-CD40 G28.5 mAb, anti- $\alpha 5\beta 1$ JBS5 mAb, anti- $\alpha M\beta 2$ mAb or anti- $\alpha IIb\beta 3$ mAb followed by goat anti-mouse IgG-Alexa488 staining. Binding of sCD154 was performed using recombinant sCD154-Alexa488 or with unlabeled sCD154, followed by anti-V5 streptavidin-PE. For competition binding, sCD154-Alexa488 was incubated with $\alpha 5\beta 1$ or sCD40 (10 fold molar excess) for 1 hour at 37°C prior to binding. Cells were also incubated with unlabeled sCD154 for 1 hour at 37°C prior to addition of sCD154-Alexa488 for fluorescence specificity. All samples were analysed on a BD LSRII flow cytometer (BD Biosciences, Mountain View, CA) and cells were gated by their characteristic forward and side scatter properties.

Cell stimulation for assessing intracellular signalling

Jurkat E6.1 T cells were incubated for 3 hours at 37°C in serum-free advanced RPMI media 1640 and stimulated with sCD154 or anti- $\alpha 5\beta 1$ JBS5 for the indicated periods of time. Reactions were terminated by addition of 2X Laemmli sample buffer containing protease and phosphatase inhibitors (Sigma-Aldrich, Oaskville, ON). Samples were then boiled for 5 minutes at 95°C and analysed by immunoblot as described below.

Cell death

Jurkat E6.1 cells were first pre-incubated with sCD154 or vehicle for 3 hours at 37°C prior to treatment with anti-Fas mAb (CH-11) or isotype-matched control (IgM) for 18 hours at 37°C. HUT78 cells were pre-incubated with sCD154 or vehicle for 3 hours at 37°C and then treated with anti-Fas mAb (CH-11) or isotype-matched control (IgM) for 48 hours at 37°C. Cell death was evaluated by FACS analysis as the percentage of death obtained by propidium iodide (Invitrogen, Burlington, ON) staining.

Caspase-8 activation

Jurkat E6.1 T cells were pre-treated or not with sCD154 for 6 hours at 37°C and stimulated with the anti-Fas clone CH-11 antibody or isotype-matched control (IgM) for 3h at 37°C. Cells were then boiled for 7 min and caspase-8 cleavage was assessed by immunoblot as described below.

SDS-PAGE and Immunoblot analysis

Proteins were resolved in 8% to 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) gels and transferred to nitrocellulose membranes. The membranes were blocked with 5% bovine serum albumin for 1 hour, washed three times with TBS/T (150 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 7.4, 0.1 % Tween-20) and incubated with the appropriate primary antibody overnight at 4°C. Following washing steps, membranes were labeled with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody for 1 hour, washed and bound peroxidase activity was detected by enhanced chemiluminescence (PerkinElmer Life Sciences, Waltham, MA). Membranes were stripped using the re-blot solution (Millipore, Temecula, CA) and re-incubated with antibodies against total ERK1/2, p38 and Akt.

Figure 1

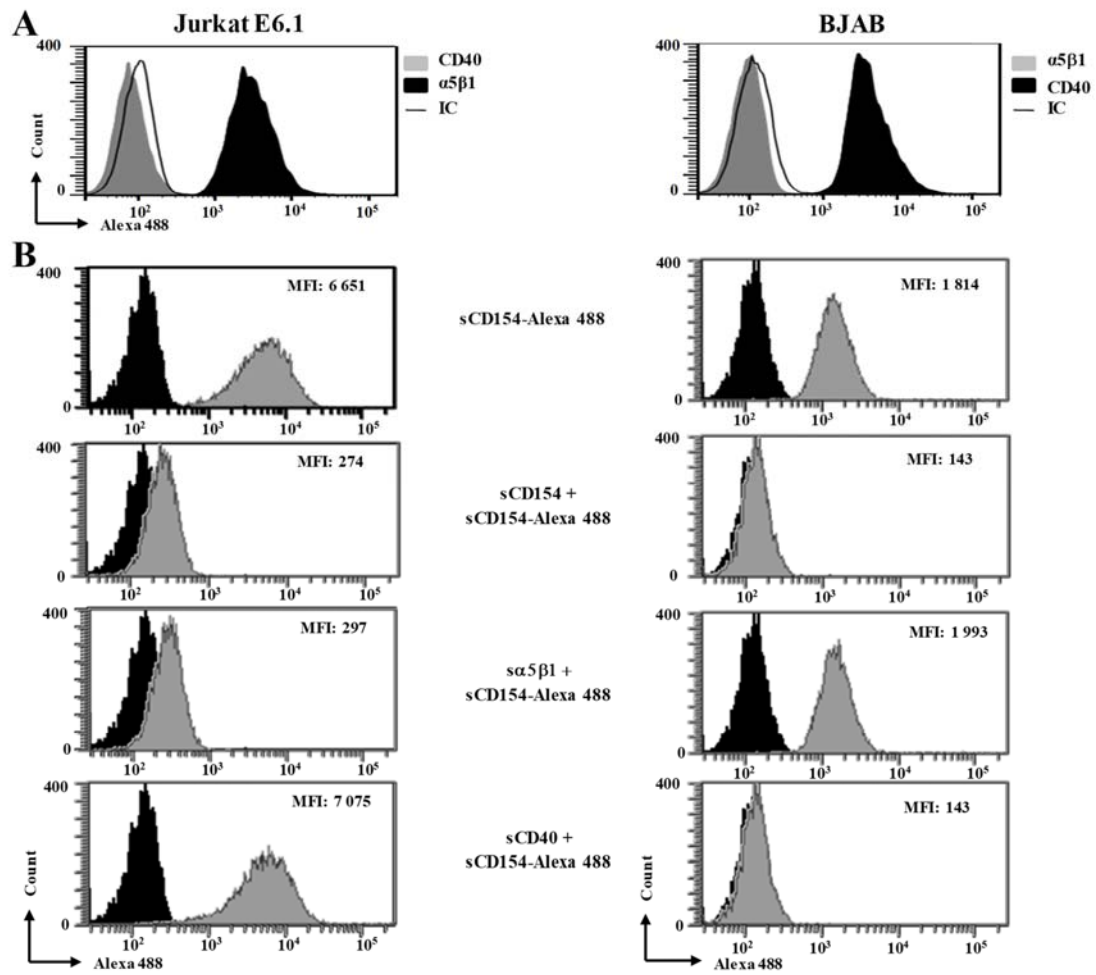


Figure 2

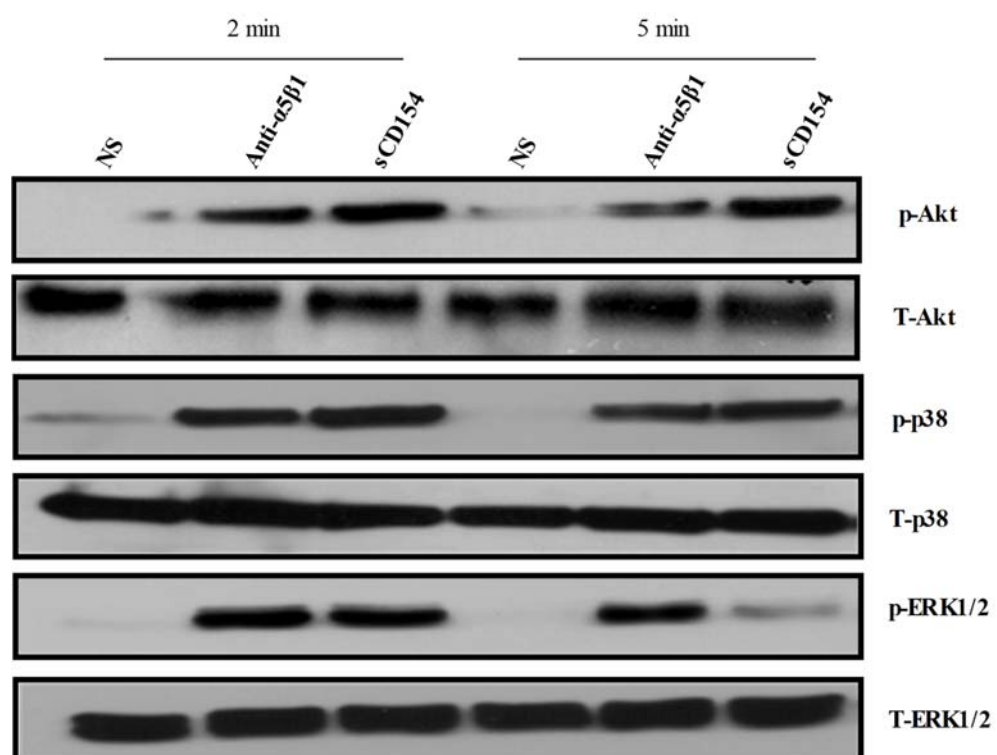
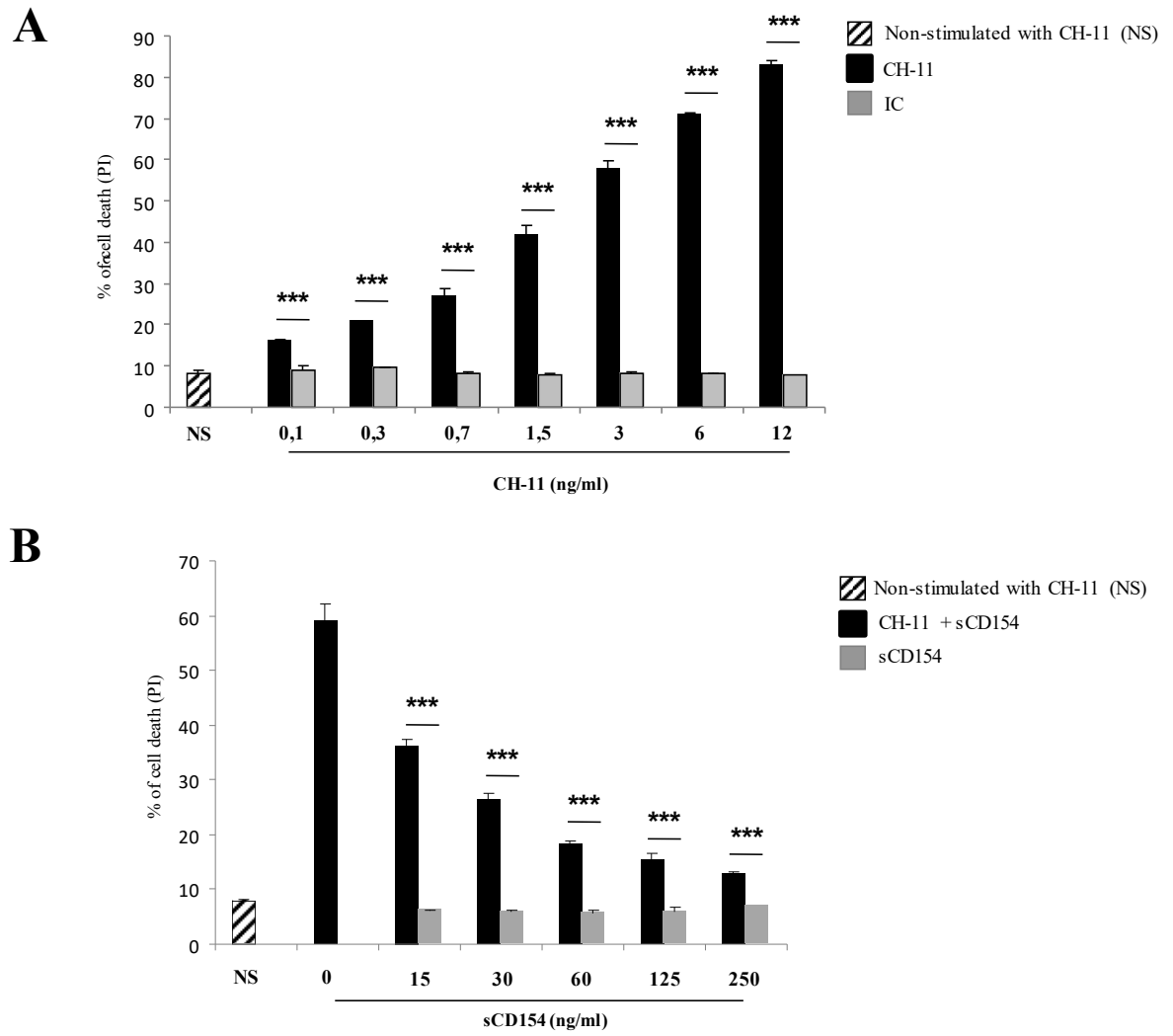


Figure 3



[illegible]

Figure 5

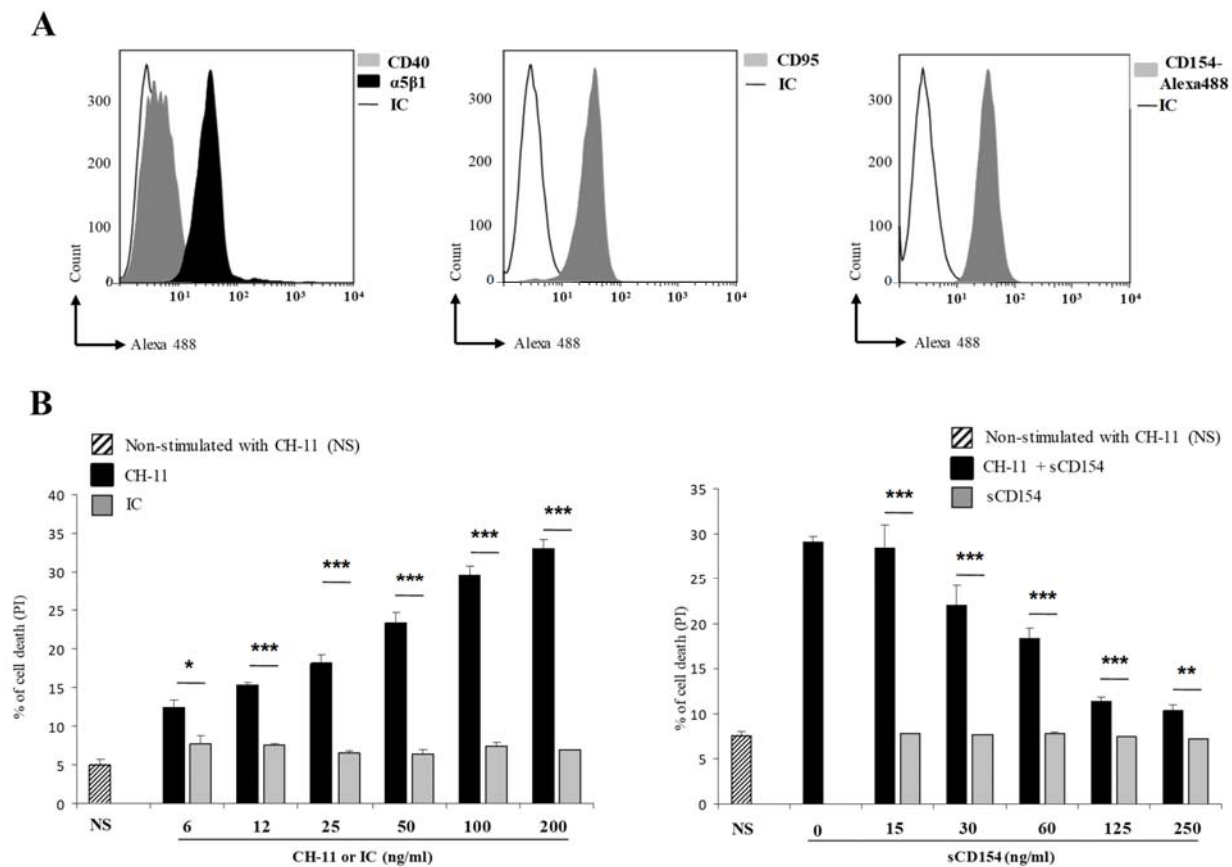


Figure 6

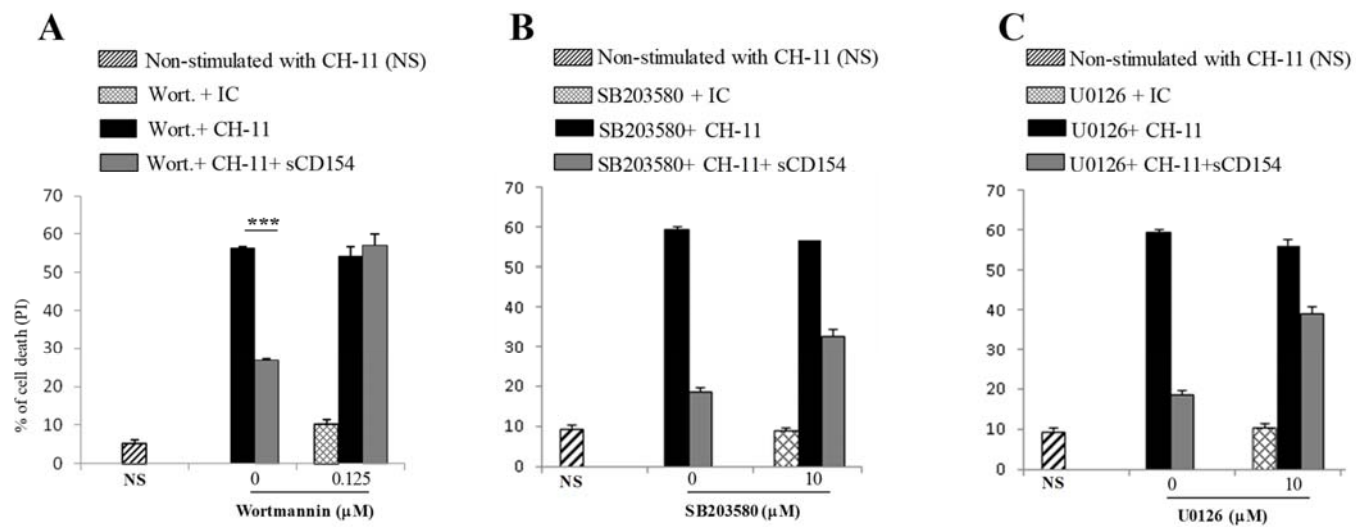


Figure 7

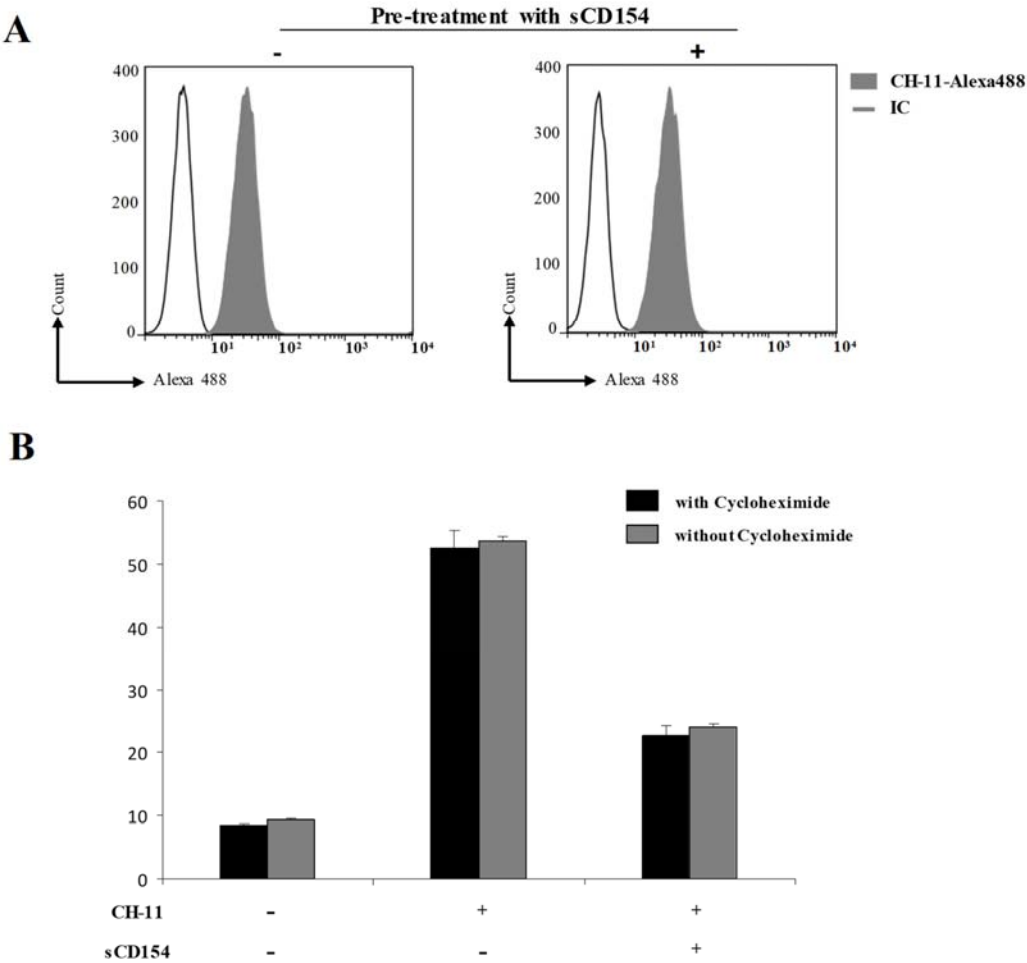
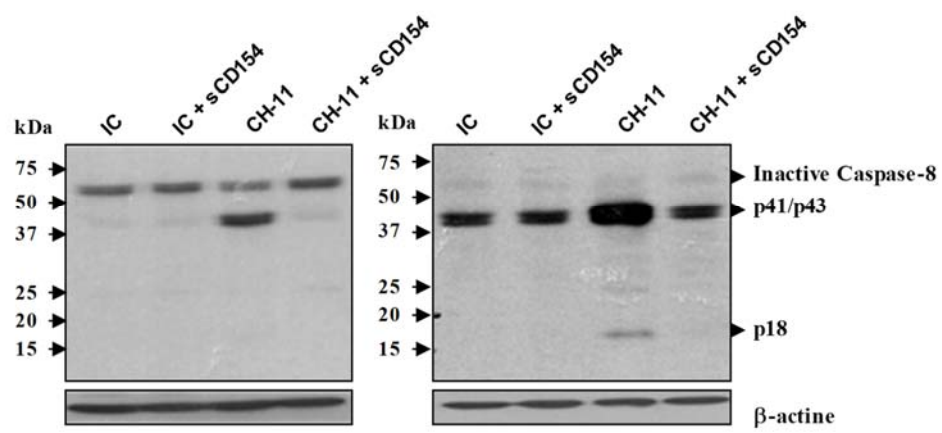


Figure 8



Figures Legends

Fig 1. Binding of sCD154 to Jurkat E6.1 T cells is $\alpha 5\beta 1$ -dependent. (A) Jurkat E6.1 and BJAB cells were incubated with anti- $\alpha 5\beta 1$ JBS5 mAb, anti-CD40 G28.5 mAb, or IgG isotype control (IC) followed by mouse anti-human Ig labeled with Alexa 488. (B) Cells were incubated with Avidin-Alexa 488 (negative control, black plots) or sCD154-Alexa 488 (20ng/sample, grey plots) in the absence or presence of 10 fold molar excess of unlabelled sCD154, $\alpha 5\beta 1$, or sCD40. Expression and binding was then analyzed by flow cytometry. Overlay plots shown are representative of at least 3 independent experiments.

Fig 2. Soluble CD154 induces intracellular signaling in Jurkat E6.1 T cells. Jurkat E6.1 cells were activated with sCD154 (50 ng/sample) or anti- $\alpha 5\beta 1$ JBS5 mAb (500 ng/sample) for the indicated time at 37°C and reactions were terminated by addition of 2X Laemmli sample buffer containing protease and phosphatase inhibitors. Samples were then analyzed by western blot for Akt, p38 and ERK1/2 activation using phospho-specific antibodies. Blots were stripped and reprobed with antibodies against total Akt, total p38 and total ERK1/2. Blots shown are representative of 3 independent experiments.

Fig 3. Soluble CD154 inhibits Fas-mediated cell death in Jurkat E6.1 T cells. (A) Jurkat E6.1 T cells were left non-stimulated (NS) or stimulated with different concentrations of anti-Fas CH-11 mAb or IgM isotype control (IC) for 18 hours at 37°C and assessed for their cell death response by FACS analysis as the percentage of death obtained by propidium iodide staining. (B) Jurkat E6.1 T cells were pre-treated with different concentrations of sCD154, then left non-stimulated (NS) or stimulated with the anti-Fas CH-11 mAb (3ng/ml) for 18 h at 37°C. Cell death was then evaluated as above (\pm SD, *** $p < 0.001$).

Fig 4. Anti- $\alpha 5\beta 1$ Abs inhibit Fas-mediated cell death in Jurkat E6.1 T cells. (A) Jurkat E6.1 T cells were pre-treated with 2 μ g/ml of isotype control (IgG, IC) or different anti- $\alpha 5\beta 1$ Abs, JBS5, 3S3, JB1A, B3B11, then left non-stimulated (NS) or stimulated with the anti-Fas CH-11 mAb (3ng/ml) for 18 h at 37°C. Cell death was

then evaluated by FACS analysis as the percentage of death obtained by propidium iodide staining. (B) Jurkat E6.1 T cells were pre-treated with isotype control (IgG, IC) or different concentrations of the anti- $\alpha 5\beta 1$, B3B11, then left non-stimulated (NS) or stimulated with the anti-Fas CH-11 mAb (3ng/ml) for 18 h at 37°C. Cell death was then evaluated as above (\pm SD, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Fig 5. Soluble CD154 inhibits Fas-mediated cell death in HUT78 T cells. (A, *Left and middle pannels*) HUT78 cells were incubated with anti- $\alpha 5\beta 1$ JBS5 mAb, anti-CD40 G28.5 mAb, anti-Fas LOB3/17 mAb, or IgG isotype control (IC) followed by mouse anti-human Ig labeled with Alexa 488. (A, *Right panel*) Cells were incubated with Avidin-Alexa 488 (negative control) or sCD154-Alexa 488 (20ng/sample). (B, *Left panel*) HUT78 T cells were left non-stimulated (NS) or stimulated with different concentrations of anti-Fas CH-11 mAb or IgM isotype control (IC) for 48 hours at 37°C and assessed for their cell death response by FACS analysis as the percentage of death obtained by propidium iodide staining. (B, *Right panel*) HUT78 cells were pre-treated with different concentrations of sCD154, then left non-stimulated (NS) or stimulated with the anti-Fas CH-11 mAb (200ng/ml) for 48 h at 37°C. Cell death was then evaluated as above (\pm SD, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ CH-11 versus IC).

Fig 6. The CD154-mediated inhibition of Fas-induced apoptosis is regulated mainly by the PI-3K/Akt pathway but also by the p38 and the ERK1/2 signaling cascades. Jurkat E6.1 cells were pre-incubated with 0.125 μ M of Wortmannin (A), with 10 μ M of SB203580 (B) or with 10 μ M of U0126 (C) for 30 minutes at 37°C. Cells were subsequently incubated with or without sCD154 for an additional 3 hrs, and then stimulated with anti-Fas CH-11 mAb (3ng/ml) or IgM isotype control (IC) for 18 hours at 37°C and assessed for their cell death response by FACS analysis as the percentage of death obtained by propidium iodide staining. Data are representative of means of four independent experiments (\pm SD, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Fig 7. Soluble CD154-mediated inhibition of Fas-induced cell death does not influence Fas expression and is independent of de novo protein synthesis.(A)

Jurkat E6.1 T cells incubated with medium alone or sCD154 (50 ng/ml) for 3 h were washed and stained with anti-Fas CH-11 labeled with Alexa 488 or IgM isotype control (IC) labeled with Alexa488. Cells were then washed and analyzed by flow cytometry. (B) Jurkat E6.1 T cells were pre-incubated with 35 ng/ml cycloheximide or vehicle DMSO for 15 min at 37°C. Samples were subsequently incubated with sCD154 (50 ng/ml) or left untreated for 3 h at 37°C, and cell death was induced by the anti-Fas CH-11 mAb (3 ng/ml) for 18 hours at 37°C. Data are representative of three independent experiments.

Fig 8. Soluble CD154 inhibits Fas-mediated T cell death by inhibiting caspase-8 cleavage. Jurkat E6.1 T cells were pre-treated or not with sCD154 (50 ng/ml) for 6h at 37°C and stimulated with the anti-Fas CH-11 mAb (12 ng/ml) or with an isotype-matched control (IgM) for 3h at 37°C. Cells were then boiled for 7 minutes and caspase-8 cleavage was assessed by immunoblot using two different anti-caspase-8 antibodies (clone 1C12 for the detection of full length caspase-8 [57 kDa] as well as cleaved intermediates [p44/p43 and p18 fragments] (left panel) and clone 18C8 for the detection of cleaved intermediates only [p44/p43 and p18 fragments]) (right panel). Blots shown are representative of 3 independent experiments.

Acknowledgments

The authors would like to acknowledge Mr. Haydar Alturaihi for the generation of recombinant sCD154.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Armitage RJ, Fanslow WC, Strockbine L, Sato TA, Clifford KN, Macduff BM, et al. (1992) Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40. *Nature* 357: 80-82.
2. Lederman S, Yellin MJ, Krichevsky A, Belko J, Lee JJ, Chess L (1992) Identification of a novel surface protein on activated CD4⁺ T cells that induces contact-dependent B cell differentiation (help). *J Exp Med* 175: 1091-1101.
3. Kroczeck RA, Graf D, Brugnani D, Giliani S, Korthuer U, Ugazio A, et al. (1994) Defective expression of CD40 ligand on T cells causes "X-linked immunodeficiency with hyper-IgM (HIGM1)". *Immunol Rev* 138: 39-59.
4. Henn V, Slupsky JR, Grafe M, Anagnostopoulos I, Forster R, Muller-Berghaus G, et al. (1998) CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* 391: 591-594.
5. Karmann K, Hughes CC, Schechner J, Fanslow WC, Pober JS (1995) CD40 on human endothelial cells: inducibility by cytokines and functional regulation of adhesion molecule expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 4342-4346.
6. Mach F, Schonbeck U, Fabunmi RP, Murphy C, Atkinson E, Bonnefoy JY, et al. (1999) T lymphocytes induce endothelial cell matrix metalloproteinase expression by a CD40L-dependent mechanism: implications for tubule formation. *Am J Pathol* 154: 229-238.
7. Schonbeck U, Mach F, Sukhova GK, Herman M, Graber P, Kehry MR, et al. (2000a) CD40 ligation induces tissue factor expression in human vascular smooth muscle cells. *Am J Pathol* 156: 7-14.
8. Peters AL, Stunz LL, Bishop GA (2009) CD40 and autoimmunity: the dark side of a great activator. *Semin Immunol* 21: 293-300.
9. Khanna R, Cooper L, Kienzle N, Moss DJ, Burrows SR, Khanna KK (1997) Engagement of CD40 antigen with soluble CD40 ligand up-regulates peptide transporter expression and restores endogenous processing function in Burkitt's lymphoma cells. *J Immunol* 159: 5782-5785.
10. Hill SC, Youde SJ, Man S, Teale GR, Baxendale AJ, Hislop A, et al. (2005) Activation of CD40 in cervical carcinoma cells facilitates CTL responses and augments chemotherapy-induced apoptosis. *J Immunol* 174: 41-50.

11. Li D, Zhong Y, Zhou Y, Sun H, Zheng X, Zhao C, et al. (2013) Autocrine TNF- α -mediated NF- κ B activation is a determinant for evasion of CD40-induced cytotoxicity in cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 436: 467-472.
12. Bussolati B, Russo S, Deambrosis I, Cantaluppi V, Volpe A, Ferrando U, et al. (2002) Expression of CD154 on renal cell carcinomas and effect on cell proliferation, motility and platelet-activating factor synthesis. *Int J Cancer* 100: 654-661.
13. Tamura N, Kobayashi S, Kato K, Bando H, Haruta K, Oyanagi M, et al. (2001) Soluble CD154 in rheumatoid arthritis: elevated plasma levels in cases with vasculitis. *J Rheumatol* 28: 2583-2590.
14. Kato K, Santana-Sahagun E, Rassenti LZ, Weisman MH, Tamura N, Kobayashi S, et al. (1999) The soluble CD40 ligand sCD154 in systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 104: 947-955.
15. Sanguigni V, Pignatelli P, Lenti L, Ferro D, Bellia A, Carnevale R, et al. (2005) Short-term treatment with atorvastatin reduces platelet CD40 ligand and thrombin generation in hypercholesterolemic patients. *Circulation* 111: 412-419.
16. Heeschen C, Dimmeler S, Hamm CW, van den Brand MJ, Boersma E, Zeiher AM, et al. (2003) Soluble CD40 ligand in acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 348: 1104-1111.
17. Clodi K, Asgary Z, Zhao S, Kliche KO, Cabanillas F, Andreeff M, et al. (1998) Coexpression of CD40 and CD40 ligand in B-cell lymphoma cells. *Br J Haematol* 103: 270-275.
18. Roselli M, Mineo TC, Basili S, Martini F, Mariotti S, Aloe S, et al. (2004) Soluble CD40 ligand plasma levels in lung cancer. *Clin Cancer Res* 10: 610-614.
19. Mielczarek-Palacz A, Sikora J, Kondera-Anasz Z, Hauza G (2013) Imbalance in serum soluble CD30/CD30L and CD40/CD40L systems are associated with ovarian tumors. *Hum Immunol* 74: 70-74.
20. Andre P, Prasad KS, Denis CV, He M, Papalia JM, Hynes RO, et al. (2002) CD40L stabilizes arterial thrombi by a β 3 integrin--dependent mechanism. *Nat Med* 8: 247-252.

21. Zirlik A, Maier C, Gerdes N, MacFarlane L, Soosairajah J, Bavendiek U, et al. (2007) CD40 ligand mediates inflammation independently of CD40 by interaction with Mac-1. *Circulation* 115: 1571-1580.
22. Leveille C, Bouillon M, Guo W, Bolduc J, Sharif-Askari E, El-Fakhry Y, et al. (2007) CD40 ligand binds to alpha5beta1 integrin and triggers cell signaling. *J Biol Chem* 282: 5143-5151.
23. Prasad KS, Andre P, He M, Bao M, Manganello J, Phillips DR (2003) Soluble CD40 ligand induces beta3 integrin tyrosine phosphorylation and triggers platelet activation by outside-in signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 12367-12371. Epub 12003 Sep 12330.
24. Alturaihi H, Hassan GS, Al-Zoobi L, Salti S, Darif Y, Yacoub D, et al. (2015) Interaction of CD154 with different receptors and its role in bidirectional signals. *Eur J Immunol* 45: 592-602.
25. Aoudjit F, Vuori K (2000) Engagement of the alpha2beta1 integrin inhibits Fas ligand expression and activation-induced cell death in T cells in a focal adhesion kinase-dependent manner. *Blood* 95: 2044-2051.
26. Naci D, Aoudjit F (2014) Alpha2beta1 integrin promotes T cell survival and migration through the concomitant activation of ERK/Mcl-1 and p38 MAPK pathways. *Cell Signal* 26: 2008-2015.
27. Gendron S, Couture J, Aoudjit F (2003) Integrin alpha2beta1 inhibits Fas-mediated apoptosis in T lymphocytes by protein phosphatase 2A-dependent activation of the MAPK/ERK pathway. *J Biol Chem* 278: 48633-48643.
28. Lin YP, Su CC, Huang JY, Lin HC, Cheng YJ, Liu MF, et al. (2009) Aberrant integrin activation induces p38 MAPK phosphorylation resulting in suppressed Fas-mediated apoptosis in T cells: implications for rheumatoid arthritis. *Mol Immunol* 46: 3328-3335.
29. Liu CC, Leclair P, Yap SQ, Lim CJ (2013) The membrane-proximal KXGFFKR motif of alpha-integrin mediates chemoresistance. *Mol Cell Biol* 33: 4334-4345.
30. Naci D, El Azreq MA, Chetoui N, Lauden L, Sigaux F, Charron D, et al. (2012) alpha2beta1 integrin promotes chemoresistance against doxorubicin in cancer cells through extracellular signal-regulated kinase (ERK). *J Biol Chem* 287: 17065-17076.

31. Ivanoff J, Talme T, Sundqvist KG (2005) The role of chemokines and extracellular matrix components in the migration of T lymphocytes into three-dimensional substrata. *Immunology* 114: 53-62.
32. El Fakhry Y, Alturaihi H, Yacoub D, Liu L, Guo W, Leveille C, et al. (2012) Functional Interaction of CD154 Protein with alpha5beta1 Integrin Is Totally Independent from Its Binding to alphaIIb beta3 Integrin and CD40 Molecules. *J Biol Chem* 287: 18055-18066.
33. Portt L, Norman G, Clapp C, Greenwood M, Greenwood MT (2011) Anti-apoptosis and cell survival: a review. *Biochim Biophys Acta* 1813: 238-259.
34. Bunn PA, Jr., Foss FM (1996) T-cell lymphoma cell lines (HUT102 and HUT78) established at the National Cancer Institute: history and importance to understanding the biology, clinical features, and therapy of cutaneous T-cell lymphomas (CTCL) and adult T-cell leukemia-lymphomas (ATLL). *J Cell Biochem Suppl* 24: 12-23.
35. Garrone P, Neidhardt EM, Garcia E, Galibert L, van Kooten C, Banchereau J (1995) Fas ligation induces apoptosis of CD40-activated human B lymphocytes. *J Exp Med* 182: 1265-1273.
36. Wierda WG, Cantwell MJ, Woods SJ, Rassenti LZ, Prussak CE, Kipps TJ (2000) CD40-ligand (CD154) gene therapy for chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 96: 2917-2924.
37. Plumas J, Jacob MC, Chaperot L, Molens JP, Sotto JJ, Bensa JC (1998) Tumor B cells from non-Hodgkin's lymphoma are resistant to CD95 (Fas/Apo-1)-mediated apoptosis. *Blood* 91: 2875-2885.
38. Schattner E, Friedman SM (1996) Fas expression and apoptosis in human B cells. *Immunol Res* 15: 246-257.
39. Pradelli LA, Beneteau M, Ricci JE (2010) Mitochondrial control of caspase-dependent and -independent cell death. *Cell Mol Life Sci* 67: 1589-1597.
40. Toubi E, Shoenfeld Y (2004) The role of CD40-CD154 interactions in autoimmunity and the benefit of disrupting this pathway. *Autoimmunity* 37: 457-464.
41. Loubaki L, Semlali A, Boisvert M, Jacques E, Plante S, Aoudjit F, et al. (2010) Crosstalk between T cells and bronchial fibroblasts obtained from asthmatic

- subjects involves CD40L/alpha 5 beta 1 interaction. *Mol Immunol* 47: 2112-2118.
42. Elgueta R, Benson MJ, de Vries VC, Wasiuk A, Guo Y, Noelle RJ (2009) Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunol Rev* 229: 152-172.
 43. Giancotti FG, Tarone G (2003) Positional control of cell fate through joint integrin/receptor protein kinase signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19: 173-206.
 44. Wary KK, Mariotti A, Zurzolo C, Giancotti FG (1998) A requirement for caveolin-1 and associated kinase Fyn in integrin signaling and anchorage-dependent cell growth. *Cell* 94: 625-634.
 45. Forsyth CB, Pulai J, Loeser RF (2002) Fibronectin fragments and blocking antibodies to alpha2beta1 and alpha5beta1 integrins stimulate mitogen-activated protein kinase signaling and increase collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) production by human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum* 46: 2368-2376.
 46. Stupack DG, Cheresh DA (2002) Get a ligand, get a life: integrins, signaling and cell survival. *J Cell Sci* 115: 3729-3738.
 47. De Toni-Costes F, Despeaux M, Bertrand J, Bourogaa E, Ysebaert L, Payraastre B, et al. (2010) A New alpha5beta1 integrin-dependent survival pathway through GSK3beta activation in leukemic cells. *PLoS One* 5: e9807.
 48. Hsieh YT, Gang EJ, Geng H, Park E, Huantes S, Chudziak D, et al. (2013) Integrin alpha4 blockade sensitizes drug resistant pre-B acute lymphoblastic leukemia to chemotherapy. *Blood* 121: 1814-1818.
 49. Mori Y, Shimizu N, Dallas M, Niewolna M, Story B, Williams PJ, et al. (2004) Anti-alpha4 integrin antibody suppresses the development of multiple myeloma and associated osteoclastic osteolysis. *Blood* 104: 2149-2154.
 50. Hock BD, McKenzie JL, Patton NW, Drayson M, Taylor K, Wakeman C, et al. (2006) Circulating levels and clinical significance of soluble CD40 in patients with hematologic malignancies. *Cancer* 106: 2148-2157.
 51. Su CC, Lin YP, Cheng YJ, Huang JY, Chuang WJ, Shan YS, et al. (2007) Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt activation by integrin-tumor matrix

- interaction suppresses Fas-mediated apoptosis in T cells. *J Immunol* 179: 4589-4597.
52. Garcia S, Liz M, Gomez-Reino JJ, Conde C (2010) Akt activity protects rheumatoid synovial fibroblasts from Fas-induced apoptosis by inhibition of Bid cleavage. *Arthritis Res Ther* 12: R33.
53. El Fakhry Y, Alturaihi H, Diallo D, Merhi Y, Mourad W (2010) Critical role of lipid rafts in CD154-mediated T cell signaling. *Eur J Immunol* 40: 770-779.
54. Nadiri A, Polyak MJ, Jundi M, Alturaihi H, Reyes-Moreno C, Hassan GS, et al. (2011) CD40 translocation to lipid rafts: Signaling requirements and downstream biological events. *Eur J Immunol* 41: 2358-2367.

**4. Le CD154 inhibe la mort des
cellules T par une interaction
cis avec l'intégrine $\alpha 5\beta 1$
(Article # 2)**

Soumis dans PlosOne

4.1 Mise en contexte

Étant donné que nos précédents résultats ont montré que l'interaction CD154/ $\alpha 5\beta 1$ joue un rôle important dans l'inhibition de la mort cellulaire induite par Fas dans les lignées de cellules T Jurkat E6.1 et HUT78, nous avons voulu étudier si cette réponse était observée avec d'autres récepteurs de mort tels que le TRAIL et le TNF- α . Il était crucial pour nous aussi d'identifier l'influence du CD154 sur la réponse apoptotique des cellules T primaires et d'étudier si comme le sCD154, le mCD154 était capable d'interagir avec l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et inhiber la mort induite par les différents récepteurs Fas, TRAIL et TNF dans les cellules T.

4.2 Contribution des co-auteurs

Bachsais Meriem: planification et réalisation des expériences (figure 1, 2, 3, 4, 5, 6), analyse des données, rédaction et correction de l'article.

Suzanne Salti: production des recombinants, transfection des cellules Hek 293 et Jurkat E6.1.

Koussay Zaoui: réalisation des figures de microscopie.

Ghada S. Hassan: planification des expériences, analyse des données, rédaction de l'article.

Fawzi Aoudjit: planification des expériences, analyse des données, rédaction de l'article.

Walid Mourad: planification des expériences, analyse des données, rédaction de l'article.

4.3 Résumé

Le CD154 est un immunomodulateur appartenant à la famille des facteurs de nécrose tumorale (TNF). Il joue un rôle majeur dans la pathogenèse de plusieurs maladies auto-immunes et inflammatoires. En plus du CD40, d'autres récepteurs ont été identifiés pour le CD154, les intégrines α IIb β 3, α M β 2, α v β 3 et α 5 β 1. De manière intéressante, nous avons précédemment montré que le sCD154 interagissant avec l'intégrine α 5 β 1 est capable d'inhiber l'apoptose induite par Fas dans plusieurs lignées de cellules T. Dans la présente étude, nous montrons que cet effet de l'interaction sCD154/ α 5 β 1 n'est pas spécifique à l'apoptose induite par Fas et pourrait également être exposé à d'autres signaux de mort tels que TRAIL et TNF- α . Fait intéressant, nous montrons ici que le mCD154 exprimé sur les cellules HEK 293 ou LTK, suite à son interaction avec l'intégrine α 5 β 1 des cellules Jurkat, n'était pas capable d'influencer la réponse de mort induite par Fas et TRAIL dans ces dernières. De plus, nos expériences de co-culture ont montré l'absence d'interaction physique entre les cellules exprimant le CD154 et les cellules exprimant α 5 β 1 à leur surface. Cependant, le mCD154 était capable d'interagir avec l'intégrine α 5 β 1 lorsque les deux molécules sont exprimées à la surface d'une même cellule. Cette interaction était capable de réguler négativement l'apoptose induite par Fas, TNF- α ou TRAIL. Une co-localisation des deux molécules a également été mise en évidence à la surface de ces cellules. Ces données suggèrent fortement une interaction de type cis entre le CD154 et l'intégrine α 5 β 1 lorsqu'elles sont exprimées sur la même surface cellulaire, plutôt qu'une interaction trans impliquant le ligand et le récepteur exprimés chacun à la surface d'une cellule distincte. De manière intéressante, et pour ajouter une signification clinique à nos données, nous démontrons ici que le sCD154 est capable d'inhiber la mort cellulaire induite par Fas également dans les cellules T humaines et plus important encore dans les cellules T CD4⁺ que T CD8⁺. Dans l'ensemble, ces résultats s'ajoutent à la liste des rôles par lesquels CD154 contribue à la pathogenèse des maladies autoimmunes et inflammatoires, en protégeant les cellules T de la mort cellulaire et en améliorant leur survie.

CD154 inhibits death of T cells via a cis interaction with the $\alpha 5\beta 1$ integrin

Meriem Bachsais¹, Suzanne Salti¹, Kossay Zaoui¹, Ghada S. Hassan¹,
Fawzi Aoudjit² and Walid Mourad^{1†}

¹Laboratoire d'Immunologie Cellulaire et Moléculaire, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CR-CHUM), 900 rue Saint-Denis, Tour Viger, Montréal, QC, H2X 0A9, Canada; ²Centre de recherche du CHU de Québec-Université Laval, 2705, Boul. Laurier, Bloc T1-49, Qc , QC, G1V 4G2, Canada

† To whom correspondence should be addressed: Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CR-CHUM), 900 rue Saint-Denis, Tour Viger, Room 10-482, Montréal, Qc, Canada, H2X 0A9; Tel: 514-890-8000 Ext: 35287; Fax: 514-412-7314; E-mail: mw.mourad@umontreal.ca

This work was supported by the Heart and Stroke Foundation of Canada

Abbreviations: sCD154, soluble CD154, TNF, tumor necrosis factor; TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL.

Abstract

CD154 plays a major role in the pathogenesis of several autoimmune and inflammatory diseases. In addition to CD40, soluble CD154 (sCD154) binds to other receptors namely α IIb β 3, α M β 2 and α 5 β 1 and α v β 3 integrins. We have previously reported that binding of sCD154 to α 5 β 1 integrin expressed on several human T cell lines is capable of inhibiting Fas-induced cell death. In the current study, we show that such effect of the sCD154/ α 5 β 1 interaction is not restricted to the cell death response induced by Fas but could also be exhibited toward other death signals such as TRAIL and TNF- α . We also demonstrate that sCD154 is capable of inhibiting Fas-mediated death of human activated T cells, more importantly of CD4⁺ than CD8⁺ T ones. Our data also show that membrane-bound CD154 and α 5 β 1 integrin expressed on the surface of distinct cells failed to influence cell death responses. However, when membrane-bound CD154 and α 5 β 1 are expressed on the surface of same cell, their interaction was capable of down regulating cell death. CD154 was shown to co-localize with the α 5 β 1 integrin on the surface of these cells. These data strongly suggest a cis-type of interaction between CD154 and α 5 β 1 when both are expressed on the same cell surface, rather than a trans-interaction which usually implicates the ligand and its receptor each expressed on the surface of a distinct cell. Taken together, these findings add to the list of roles through which CD154 is contributing to the pathogenesis of autoimmune-inflammatory diseases, i.e. by protecting T cells from death and enhancing their survival.

Introduction

CD154, also known as CD40 ligand (CD40L), is an immunomodulator initially described in activated CD4-positive T cells and later found to be expressed on other types of cells such as basophiles, mast cells, activated CD8-positive T cells and platelets (1, 2). Similarly to other members of the TNF family, in addition to the membrane-bound molecule, CD154 also exists in a soluble form (sCD154) that is still biologically active (3). This soluble form is usually released from activated T cells and platelets by proteolytic cleavage (3, 4). Soluble CD154 is exhibited at high levels in many inflammatory disorders (5-7), including rheumatoid arthritis (RA) and sytemic lupus erythromatus (SLE) diseases (8, 9).

Together with its classical receptor CD40, CD154 is implicated in humoral as well as cell-mediated immunity (2, 10). By acting on several immune/inflammatory cells, CD154 influences their functions and activation status (2, 11). Interestingly, during cell/cell interaction, binding of CD154 to CD40 molecules leads to bidirectional signals that modulate cell functions (12-15). Blocking the CD154/CD40 interaction using different experimental approaches was shown to completely abolish the development of several autoimmune conditions (2, 16), such as RA and SLE (17-20).

In addition to CD40, sCD154 was shown to bind other receptors, namely the α IIB β 3 (21), α M β 2 (22), α 5 β 1 (23) and α v β 3 integrins (24). The interaction of sCD154 with α IIB β 3 on platelets was shown to stabilize thrombus under high sheer conditions (25), while that with α M β 2 was reported to promote the development of inflammation in the vessels and atherosclerosis (22), and to play a role in Th1 immune responses against *Leishmania major* infections (26). The α v β 3 integrin was identified as a receptor for CD154. Although no functional studies were undertaken but authors expected a high biological significance for the CD154/ α v β 3 interaction given the high expression of α v β 3 on vascular and cancer cells (24).

In this context, we have demonstrated that stimulating an α 5 β 1-positive monocytic cell line with sCD154 induces the activation of MAPK/ERK1/2 pathway and IL-8 production in a CD40-independent manner (23). Interestingly, ligation of the α 5 β 1 integrin simultaneously with ligation of CD40 was shown to activate p38 and ERK1/2 MAPK and to synergize in the release of inflammatory mediators such

as MMP-2 and -9 (27). Furthermore, the physiopathological relevance of the CD154/ $\alpha 5\beta 1$ dyad could be implicated in the development of allergic asthma given data showing that the CD154/ $\alpha 5\beta 1$ interaction enhances the production of inflammatory cytokines in T cells and bronchial fibroblasts of asthmatic patients during cell/cell interaction (28). Interestingly, our recent results showed that CD154 is capable of binding to several T cell lines via their $\alpha 5\beta 1$ integrin inducing the activation of p38, ERK, and Akt (29). We also demonstrated that treatment of these cells with CD154 entirely abrogated their Fas-induced death, in a mechanism involving activation of PI-3K and a decreased cleavage of caspase-8 (29).

Given that T cell survival and persistence is a characteristic signature of numerous inflammatory and autoimmune diseases, we aimed herein at further examining the effect of the CD154/ $\alpha 5\beta 1$ dyad on T cell survival. We found that binding of sCD154 to $\alpha 5\beta 1$ integrin also inhibits apoptosis of T cell lines and human primary T cells induced by the TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and TNF- α . Furthermore, our studies suggest that the anti-apoptotic effect of CD154 is exerted in a cis-dependent manner, i.e both CD154 and $\alpha 5\beta 1$ are expressed on the surface of the same cell.

Materials and Methods

4.3.1 Ethics statement

This study is using PBMC samples from healthy subjects. This study received approval from the CHUM-Research Centre ethical committee, Montreal, Québec, Canada. All human subjects that donated biological samples for this study provided written informed consent for their participation.

Reagents and antibodies

Recombinant soluble CD154 (sCD154) was generated as previously described (14). Anti-CD95 or anti-Fas (clone CH-11, an IgM) was purchased from Chemicon (Temecula, CA). Recombinant human TRAIL (rhTRAIL) and rhTNF were obtained from R&D Systems (*Minneapolis, USA*). Anti-CD95 (LOB3/17, an IgG) was purchased from Bio-Rad Serotec Inc. (Raleigh, NC). The hybridoma producing antibodies raised against human CD154 (mAb C4.14) was produced in our laboratory. Anti-CD154 hybridoma 5C8 (IgG_{2a}) and anti-CD40 hybridoma G28.5 (IgG₁) were obtained from ATCC. Anti- α M β 2 antibodies (clone ICRF44) were obtained from BD Biosciences (Mississauga, ON). Anti- α 5 β 1 (clone JBS5) and anti- α IIb β 3 (clone A2A9/6) were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). The anti- β 1 mAb (clones B44) was a generous gift from Dr. John A. Wilkins (Manitoba Centre for Proteomics and Rheumatic Diseases, University of Manitoba, Winnipeg, MB). The anti-TNF-R1 (clone H398), anti-TRAIL-R1 (clone 69036) and anti-TRAIL-R2 (clone 71908) antibodies were purchased from R&D Systems (*Minneapolis, USA*). The GAM-alexa488 was obtained from Invitrogen Life Technology (Burlington, Ontario, Canada). The biotin-labelled CD40-Fc was prepared using the method provided by Pierce (Rockford, IL, USA).

Cell lines

The human Jurkat E6.1 T cell line, the BJAB B lymphoma cell line and the embryonic kidney cell line HEK 293 were obtained from ATCC (Manassas, VA) and maintained at 37°C in RPMI 1640 media supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS), 1% L-glutamine, penicillin, streptomycin (GIBCO, Burlington, ON,

Canada). Jurkat E6.1 and HEK 293 were stably transfected as we previously described (30) with human CD154 (hCD154) or empty vector (vect) and were maintained at 37°C in DMEM media supplemented with 5% FBS, 1% L-glutamine, penicillin, streptomycin and zeomycin (Invivo Gen, Cederlane Laboratories, Burlington, Canada).

Isolation of human T cells and their activation

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of healthy donors were isolated by Ficoll–Hypaque density gradient centrifugation. Purified CD3⁺, CD4⁺ and CD8⁺ T cells were isolated from PBMC by negative selection using magnetic beads (STEMCELL Technologies). The purity of the isolated CD3⁺ CD4⁺ and CD8⁺ T cells was > 96%, as determined by flow cytometric analysis. Isolated cells were then cultured in RPMI 1640 media supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% L-glutamine, penicillin and streptomycin and cultured in the presence of PHA (5 ug/ml) (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada) and IL-2 (20 U/ml) (R&D Systems) for a period of six days.

Flow cytometry analysis

The cell surface expression of CD154, CD40, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha M\beta 2$, $\alpha IIb\beta 3$, Fas, TNFR1, TRAILR1 and TRAILR2 was determined by FACS analysis. Cells were stained with the appropriate control isotype IgGs or respective antibodies (anti-CD154 mAb, C4; anti-CD40 mAb, G28.5; anti- $\alpha 5\beta 1$ (active form) mAb, B44; anti- $\alpha 5\beta 1$ (inactive form) mAb, JBS5; anti- $\alpha M\beta 2$ mAb, ICRF44; anti- $\alpha IIb\beta 3$ mAb, A2A9/6; anti-CD95 mAb, LOB3/17; anti-TNF-R1 mAb, H398; anti-TRAIL-R1 mAb, C69036 and anti-TRAIL-R2 mAb, C71908, followed by goat anti-mouse IgG-Alexa488 staining. Samples were analysed on FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences, Mississauga, Ontario, Canada).

CFSE staining fluorescence microscopy

Jurkat E6.1 and BJAB cells were suspended at 10 million/ml in PBS. CFSE (Life Technologies, Ontario, Canada) was added to a final concentration of 1uM for 10 min at 37° in a water bath. After adding the RPMI 10% FBS 10min at room temperature, cells were centrifuged then suspended in RPMI at the desired

concentration before use. Labelled Jurkat E6.1 and BJAB cells were added on HEK 293-vect. or HEK 293-hCD154 already adhered to 96 well plates. After 5 min at 37°C, wells were washed to remove the free Jurkat E6.1 and BJAB cells. In some conditions, co-cultures were treated with 5C8 mAb to block the CD40/CD154 interaction. Cell/cell interactions mediated by CD154/ $\alpha 5\beta 1$ and CD154/CD40 were analyzed by fluorescence microscopy.

Immunofluorescence microscopy

CD154-transfected Jurkat E6.1 cells and non-transfected ones were grown on coverslips, fixed in 4% formaldehyde (MilliporeSigma, Billerica, MA, USA) and permeabilized in 0.2% Triton X-100 (ThermoFisher Scientific, Ontario, Canada). To detect CD154 molecules, biotinylated sCD40-Fc was added followed by streptavidin PE, whereas detection of $\alpha 5\beta 1$ integrin was undertaken by adding JBS5 mAb followed by GAM-alexa488. DNA was counterstained with Hoechst dye (ProLong™ Gold Antifade Mountant with DAPI (Thermo Fisher Scientific). Images were recorded using a microscope (ApoTome.2, Observer. Z1; Carl Zeiss, Inc.) with a 63× plan Apo 1.4 NA objective coupled to a camera (AxioCamHRm; Carl Zeiss, Inc.) and driven by AxioVision LE software (Carl Zeiss, Inc.). The degree of co-localization, expressed as the Pearson's correlation coefficient (proportion of all red intensities that have green components among all red intensities), was assessed by the co-localization analysis function of Imaris software (Bitplane®). Results were logged into Excel Microsoft Excel® for analysis. All values are means \pm SD from 16 cells.

Cell death

Cells were cultured in the presence or absence of sCD154 for 6 hrs and then treated with anti-Fas, rhTNF- α , rhTRAIL for an additional 18 hours at 37°C. In some experiments and when indicate, Wortmannin (Millipore Sigma, Bilerica, MA, USA) was used as a control. Cell death was evaluated by FACS analysis as the percentage of death obtained by propidium iodide (Invitrogen, Burlington, ON) staining as we previously described (29).

Statistical analysis

The Student t -test was used for statistical analysis (GraphPad Prism), and data are shown as mean \pm SD. P values <0.05 were considered statistically significant (* P < 0.05 , ** P < 0.01 , and *** P < 0.001).

Results

1-Soluble CD154 inhibits TRAIL- and TNF- α -induced cell death in Jurkat E6.1 T cells.

We have previously reported that binding of sCD154 to several human T cell lines expressing $\alpha 5\beta 1$ molecules inhibits their Fas-induced death (29). We therefore hypothesized that such dyad plays an important role in the modulation of T cell death induced by other apoptotic stimuli. As Jurkat E6.1 cells are also susceptible to death induced by other members of the TNF family, namely TRAIL and TNF- α (31-33), we aim here at assessing the impact of sCD154 on death induced by TRAIL and TNF- α in Jurkat E6.1 cells. In the first set of experiments, we analyzed the expression of the different death receptors and the CD154 receptors on the surface of these cells. Our results show that Jurkat E6.1 cells express TRAIL-R1, TRAIL-R2 and TNF-R1 on their surface (Fig. 1A), and only the $\alpha 5\beta 1$ integrin as the CD154 receptor (Fig. 1B). It is worth noting here and as previously reported, that Jurkat E6.1 cells express only the inactive form of $\alpha 5\beta 1$, capable of binding CD154 (23), and that binding of sCD154 to these cells was completely abolished by soluble $\alpha 5\beta 1$ confirming the specificity of sCD154 to $\alpha 5\beta 1$ integrin (29).

Given these data, we next evaluated the death response induced by different concentrations of human recombinant TRAIL (rTRAIL) and rTNF- α in Jurkat E6.1 cells. Our data show that treatment with rTRAIL or rTNF induces an apoptotic effect in Jurkat E6.1 cells in a concentration-dependent manner (Fig. 1C). This cell death response reached its maximal level at around 100 ng/ml of TRAIL and at 50 ng/ml of TNF- α . We next investigated the capacity of sCD154 to inhibit these death responses. Cells were pre-incubated with different concentrations of sCD154 and then treated with the sub-optimum apoptosis-inducing concentration of

TRAIL (50 ng/ml) or TNF- α (25 ng/ml) outlined above. Our data show that CD154 was capable of inhibiting TRAIL- and TNF-induced cell death in a dose-dependent manner (Fig. 1D), as it did with Fas-induced response previously described (29). Together, these results demonstrate that the CD154/ $\alpha 5\beta 1$ interaction inhibits TRAIL and TNF- α -induced death in T cell lines, confirming a role of this dyad in the persistence of T cells at the site of inflammation (34-36).

2- Soluble CD154 influences Fas-induced cell death in activated human CD3-positive T cells.

Having demonstrated the role of sCD154 in inhibiting cell death induced by various death signals in T cell lines, it was crucial to investigate the influence of CD154 on the apoptotic response of primary T cells. PBMCs from the blood of healthy donors were purified and CD3⁺ T cells were isolated. Cells were then cultured in the presence of a combination of PHA and IL-2 (37) for a period of six days, to ensure their susceptibility to Fas-induced cell death as well as the release of all CD154 from their cell surface. We first analyzed the expression of CD154 and its receptors and that of various death receptors on the surface of these activated T cells. Our data show that human T cells and as described previously (38), lose their CD154 expression after activation (Fig. 2A, left panel). Of the CD154 receptors, T cells only express the $\alpha 5\beta 1$ integrin (Fig. 2A, middle panel). The expression of $\alpha 5\beta 1$ is heterogeneous in CD3⁺ T cells. It is worth mentioning here that we did not account for the expression of $\alpha \text{IIb}\beta 3$ on T cells, as this integrin is exclusively expressed on platelets and on megakaryocytes in bone marrow (39). The Fas molecule is the only cell death receptor detected on activated T cells (Fig. 2A, right panel).

We next evaluated the death response induced via the Fas receptor and those of TRAIL and TNF- α in activated T cells. Cells were treated with different concentrations of CH-11 mAb, rhTRAIL or rhTNF- α for 24 hrs. Our data show that treatment of CD3⁺ T cells with CH-11 mAb was capable of inducing their apoptosis in a concentration-dependent manner (Fig. 2B). This cell death response reached a steady state at around 200 ng/ml of CH-11. On the other hand, CD3⁺ cells showed no death susceptibility to TNF- α and a slight one to TRAIL at all concentrations

tested (Fig. 2B). Similarly to the protocol undertaken with Jurkat E6.1 cells above, we subsequently assessed the Fas-induced apoptosis in activated CD3⁺ T cells in the presence of different concentrations of sCD154. Our data show that pre-incubation of activated T cells with sCD154 inhibited Fas-mediated apoptosis in a dose-dependent manner (Fig. 2C).

3. Soluble CD154 inhibits Fas-mediated cell death more importantly in activated CD4⁺ T cells than CD8⁺ ones.

Based on the above observation showing the heterogeneous expression of $\alpha 5\beta 1$ integrin in CD3⁺ T cells, PBMCs were purified into CD4⁺ and CD8⁺ T cells. Cells were activated with PHA and IL-2, as described above for a period of six days, and assessed for the expression of CD154 and its receptors and that of various death receptors on their surface. Our data show that CD4⁺ cells express a higher level of the $\alpha 5\beta 1$ integrin in comparison with CD8⁺ T cells. As to the death receptors, both T cell populations express only the Fas receptor and at comparable levels (Fig. 3A).

As we did with CD3⁺ T cells, we evaluated the death response induced via the Fas receptor in activated CD4⁺ and CD8⁺ T cells in the presence of different concentrations of sCD154. Our data show that pre-incubation of these activated T cell populations with sCD154 inhibited Fas-mediated apoptosis in a dose-dependent manner (Fig. 3B). Such protective effect of CD154 against Fas-mediated cell death was more importantly exhibited in CD4⁺ cells as compared to CD8⁺ ones. Indeed, CD154 slightly inhibited the Fas-induced apoptosis in CD8⁺ cells and only when used at a relatively high concentration (Fig. 3B).

Together, these results demonstrate that the CD154/ $\alpha 5\beta 1$ interaction inhibits the Fas-induced death of human T cells, more importantly that of the CD4⁺ subpopulation, reflecting a role of this dyad in the survival and persistence of T cells in inflammatory diseases.

4- Membrane-bound CD154 expressed on HEK 293 failed to influence the Fas-mediated cell death of Jurkat E6.1 and activated CD3-positive T cells.

It is well established that membrane-bound CD154 induces a stronger response in CD40- expressing cells than sCD154 (40, 41). We therefore assessed

the ability of membrane-bound CD154 to elicit similar and/or higher responses in cells expressing membrane-bound $\alpha 5\beta 1$ with regard to Fas-induced cell death. For this purpose, we used Jurkat E6.1 and activated CD3-positive T cells as the $\alpha 5\beta 1$ positive/CD154 negative cells and the HEK 293 transfected with CD154, as the CD154-positive cells (or the non-transfected ones as the negative control). Data in Fig. 4A shows the expression of CD154 on the surface of the CD154-transfected HEK 293 cells. We co-cultured Jurkat E6.1 or activated CD3-positive T cells with adherent HEK 293 transfected or not with CD154 at different cell/cell ratios (1:5, 1:3, and 1:1), and stimulated these cells with the death ligand for Fas receptor. Surprisingly, our data show that Jurkat E6.1 and activated CD3-positive T cells co-cultured with HEK 293 cells transfected with CD154 exhibited similar death levels to those cultured in the presence of non-transfected CD154-negative HEK 293 cells (Figs 4B and 4C).

The failure of membrane-bound CD154 expressed on HEK 293 cells to affect the cell death response can be due to the lack of interaction between the membrane-bound CD154 and $\alpha 5\beta 1$. To verify this hypothesis, Jurkat E6.1 were labelled with CFSE and then added to CD154-transfected-HEK 293 cells adhered to 96 well plates. As a positive control, BJAB cells expressing CD40 on their surface (Fig. 5A) were also labelled with CFSE and added to CD154-transfected-HEK 293 adhered on 96 well plates. Following a 5 min co-culture, wells were washed to remove non-adherent Jurkat E6.1 or BJAB cells, and cell/cell interactions mediated by CD154/ $\alpha 5\beta 1$ or by CD154/CD40 was analyzed by fluorescence microscopy. As shown in Fig. 5B, CFSE-labelled BJAB cells, the CD40-positive cells, bound well to CD154-transfected HEK cells (Fig. 5B upper panels). The latter cell/cell interaction was strongly inhibited by the treatment with the anti-CD154 mAb, 5C8, known to interfere with the binding of CD154 with CD40 (Fig. 5B, lower panels). In contrast, CFSE-labelled Jurkat E6.1 cells, the $\alpha 5\beta 1$ -positive cells, did not interact with the CD154-HEK 293 (Fig. 5C). These data further confirm that membrane-bound CD154 is not capable of interacting with the $\alpha 5\beta 1$ integrin on cell surface as it does with CD40.

5-Membrane-bound CD154 expressed on Jurkat E6.1 T cells inhibits their Fas, TRAIL and TNF- α -mediated cell death.

Membrane-bound ligand (s) can interact with its membrane-bound receptor (s) in two different manners: 1) Trans interaction, when the ligand and its receptor are expressed in two different cells; and 2) Cis interaction, when both ligand and its receptor are expressed on the same cell (42). Based on the above observation, we then investigated the possible interaction of membrane-bound-CD154 and $\alpha 5\beta 1$ in a cis manner. For this purpose, we used Jurkat E6.1 cells transfected with CD154 and evaluated their death response as compared to empty vector-transfected CD154-negative Jurkat cells. In the first set of experiments, we demonstrated the expression of CD154 on the surface of these cells by flow cytometry (Fig. 6A and 6B). Our results confirm that CD154-transfected Jurkat E6.1 cells exhibit CD154 expression on their surface as compared to absence of the molecule from the surface of empty vector-transfected cells.

Next, we evaluated the apoptotic response of CD154-expressing Jurkat E6.1 cells to the various death factors mentioned above in comparison to that of empty vector-transfected Jurkat E6.1 cells lacking CD154 expression. Our results show that the stimulation with different concentrations of Fas induced a downregulated death response in CD154-expressing-Jurkat E6.1 cells as compared to CD154-negative cells (Fig. 6C), and similar death patterns were observed for rTNF- α (Fig. 6D) as well as rTRAIL (Fig. 6E). Indeed, JurkatE6.1 cells transfected with CD154 were less sensitive to the apoptotic effect of Fas ligand, TRAIL and TNF- α than empty vector-transfected Jurkat E6.1 cells. These findings indicate that the CD154 expressed on the surface of Jurkat E6.1 cells was able to decrease Fas-, TNF- α -, and TRAIL-mediated death. To determine if the role of CD154 could be generalized to other forms of apoptosis, we examined its effect on apoptosis induced by the potent PI-3K inhibitor, Wortmannin (43, 44). As shown in Fig. 6F, empty vector-transfected as well as CD154-transfected Jurkat E6.1 cells exhibited similar apoptotic responses upon their stimulation with increasing concentrations of Wortmannin, indicating that CD154 does not abrogate the death response of T cells against a PI-3K inhibitor and that its effect observed above is not a non-specific effect on apoptosis in general. Together, these results demonstrate that, similarly to

the soluble form of CD154, the membrane-bound CD154 by interacting with its receptor, the $\alpha 5\beta 1$ integrin, both expressed on the surface of the same cell, was capable of inhibiting apoptosis induced by various death receptors.

6-Membrane-bound CD154 binds to membrane-bound $\alpha 5\beta 1$ in a cis manner.

We demonstrated above that membrane-bound CD154 expressed on the surface of CD154-transfected Jurkat E6.1 cells interacting with $\alpha 5\beta 1$ expressed on the same cell surface, inhibited their apoptotic responses while the membrane-bound form of CD154 expressed on another cell interacting with the $\alpha 5\beta 1$ integrin of Jurkat E6.1 cells did not affect the death response of these latter. Thus, we highly suspected that the membrane-bound form of CD154 is only capable of interacting with $\alpha 5\beta 1$ on cell surface in a cis-type of interaction. To confirm the cis-type of interaction between CD154 and the $\alpha 5\beta 1$ integrin, we undertook a double immunofluorescence staining of these molecules on cell surface. For this purpose, we used empty vector-transfected Jurkat E6.1 cells as $\alpha 5\beta 1$ positive/CD154 negative cells and CD154-transfected Jurkat E6.1 cells as $\alpha 5\beta 1$ positive/CD154 positive cells. Subsequently, we localized the CD154 and $\alpha 5\beta 1$ molecules using specific antibodies as described in the Materials and Methods section. Our data show that empty vector-transfected Jurkat E6.1 only exhibited staining for $\alpha 5\beta 1$ on cell surface (Fig. 7A), while CD154-transfected Jurkat cells showed staining for $\alpha 5\beta 1$ (Fig. 7B, left panel), for CD154 (Fig. 7B, middle panel) and a visible co-localization of both molecules on cell surface (Fig. 7B, right panel). Upon merging the red fluorescence (that of $\alpha 5\beta 1$) and the green one (that of CD154), we quantified the area of co-localization measured in individual Jurkat cells, represented as Pearson's correlation coefficient. Our quantification results confirm the cis association of $\alpha 5\beta 1$ and CD154 when both are expressed on the surface of the same cell (in CD154-transfected Jurkat E6.1, Fig. 7C). Such co-localization of CD154

and $\alpha 5\beta 1$ on cell surface of the same cell highly favours the possibility of a functional cis interaction between both molecules.

Taken together, our data confirm that the membrane-bound form of CD154 is capable of interacting with $\alpha 5\beta 1$ integrin on cell surface in a cis-type of interaction. The biological significance of this phenomenon might be to sequester the available CD154 on the surface of activated T cells with the $\alpha 5\beta 1$ integrin enhancing the T cell survival while limiting the accessibility to trans binding including its binding to the other receptors on other target cells, providing a certain form of immunological balance.

Discussion

The role of CD154 in immune responses has long been established. By interacting with its classical receptor CD40, CD154 has been implicated in humoral and cell-mediated immunity, by inducing activation of several types of immune cells as well as affecting their proliferation and apoptosis processes, contributing as such to the development of numerous inflammatory and autoimmune diseases. The more recent identification of additional receptors for CD154 solicited the interest in digging deeper into the role of CD154 in immune responses and their related pathologies. Interestingly, our group has previously shown that the CD154/ $\alpha 5\beta 1$ interaction inhibits Fas-induced death in T cell lines (29), strongly suggesting that the CD154/ $\alpha 5\beta 1$ interaction enhances the survival and persistence of T cells. In the current study, we wanted to further define the role of CD154 in T cell survival using not only T cell lines but also human primary T cells. Our data show that the sCD154 was capable of inhibiting apoptosis induced not only by Fas-Ligand, but also by other death signals, namely TRAIL and TNF- α . This is likely due to the capacity of CD154 to inhibit caspase-8 activation downstream of death receptors. Indeed, we have previously reported that CD154 inhibited Fas-induced apoptosis of Jurkat T cells by inhibiting the cleavage and activation of caspase-8 (29). Interestingly, the protective effect of CD154 is also seen in human primary T cells suggesting that $\alpha 5\beta 1$ integrin engagement with CD154 could be a critical pathway that contributes to the survival and persistence of effector T cells in inflammatory diseases. Along these lines, the effect seems to be more important for CD4⁺ than CD8⁺ T cells. Mechanisms accounting for these differences are not clear but could be due to the higher levels of $\alpha 5\beta 1$ integrin expressed by CD4⁺ and to the possibility that $\alpha 5\beta 1$ integrin is connected to different downstream signalling molecules in the two T cell populations.

Our results also show that Jurkat E6.1 cells and human T cells exhibit a surface expression of the $\alpha 5\beta 1$ integrin in its inactive form, a form shown to be the only state of the molecule capable of binding to and interacting with CD154 (23), and do not exhibit any expression of CD40 on cell surface. These results are not surprising, given the wide expression profile of $\alpha 5\beta 1$ on the surface of numerous cell types (11, 45), including T cells (46). Inducing apoptosis of T cells is a mean

by which our immune system is regulating its responses (47), trying to decrease the load of T cells in related conditions such as inflammatory and autoimmune diseases (11, 47). Thus, by inhibiting this process, the CD154/ $\alpha 5\beta 1$ dyad is contributing to T cell survival and persistence in inflammatory conditions (34-36). Many inflammatory diseases are characterized by an elevated number of T cells such as RA (48), multiple sclerosis (49, 50), celiac disease (51), and even SLE (52). Interestingly, T lymphocytes in autoimmune diseases were shown to express aberrant amounts of $\beta 1$ integrins (53, 54). Not only the receptor, but also the ligand is increased in autoimmune/inflammatory diseases (8, 9). More importantly in this matter is the fact that not only membrane-bound but also sCD154 is elevated in autoimmune/inflammatory diseases, increasing the chance of a functional CD154/ $\alpha 5\beta 1$ interaction at least with respect to the inhibition of T cell death, since, as described by our data here, sCD154 is more potent in interacting with the $\alpha 5\beta 1$ integrin while the membrane-bound form of the molecule was not capable of such interaction in human T cells. Therefore, our results and previously reported findings highly suggest that the CD154/ $\alpha 5\beta 1$ binding is highly implicated in autoimmune/inflammatory responses, more specifically in inhibiting T cell death enhancing as such their survival and persistence in these diseases.

Going back to our data herein and our previous studies (29), showing that the soluble form of CD154 was capable of inhibiting apoptosis induced by the death signals Fas, TRAIL as well as TNF- α , we were solicited to determine if the membrane-bound form of CD154 was also capable of eliciting similar effects with regard to cell death induced by the above-mentioned apoptotic factors. In spite the fact that both membrane-bound and soluble CD154 are biologically active (3), the interaction of the former with its receptor implicates a more complex form of binding given the transmembrane structure of the membrane-bound CD154 and its anchorage in the plasma membrane. Both soluble and membrane-bound CD154 were shown capable of interacting with CD40 (55-57). As to the interaction of CD154 with its newly identified receptors, the $\alpha \text{IIb}\beta 3$ (25, 58), and $\alpha \text{M}\beta 2$ integrins (22), all data documented with respect to the induced intracellular signaling events and the subsequent biological responses describes the binding of the soluble form of CD154 with the integrins expressed on cell surface. In our current study, our data

show that Jurkat E6.1 cells that express $\alpha 5\beta 1$ on their surface co-cultured with CD154-transfected HEK 293 exhibited similar death levels as Jurkat E6.1 cells co-cultured with CD154-negative HEK, indicating that membrane-bound CD154 is not capable of interacting with the $\alpha 5\beta 1$.

Interestingly, in the matter of membrane-bound ligands and their receptors, it is well established that their interaction could be undertaken in two different manners: 1) a trans interaction, when the ligand and its receptor are expressed in two different cells; and 2) cis interaction, when both ligand and its receptor are expressed on the same cell (42). This is particularly of interest in the case of the CD154/ $\alpha 5\beta 1$ dyad, as both the ligand and the receptor could be expressed on the surface of the same cell (42). Different biological responses could even be issued from cis- as compared to the trans-type of binding in the ligand/receptor complex (42). Indeed, the cis-versus trans- type of interaction on cell membranes have been demonstrated for many cell surface molecules, among the first was the CD22 on the surface of B cells (59). Such molecule binds sialic acid on B cell surface, more importantly in a cis-fashion, owing to the high concentration of sialic acid in the B cell membrane (60). Importantly, CD22 is associated with BCR and its cis-binding to sialic acid herein is believed to halt hyperstimulation of the BCR (61). Also, ligand/receptor dyads involving protein-protein interactions were shown to exhibit a cis- and a trans-type of interaction. The Natural Killer (NK) cell inhibitory receptors specific for MHC-I molecules interact with these latter expressed on target cells (trans-fashion) as well as with MHC-I expressed on NK cells themselves (cis-interaction) (62). An example here is the Ly49A binding to the H-2D^d allele, most of which is undertaken in a cis-manner, controlling the number of receptors available for trans binding and the stability of the binding (63, 64). Interestingly, more recent studies by Saggu et al., have shown that the CD18 integrin, Mac-1, on the surface of neutrophils, is capable of cis-binding the Fc γ RIIA receptors, decreasing their affinity to IgG complexes and thus reducing the recruitment of neutrophils to the immune site (65). Indeed, authors have demonstrated that silencing of CD18 in mice using siRNA or knocking out the corresponding gene leads to an accumulation of neutrophils in kidneys upon mice injection with a nephrotoxic serum (65). Thus, the cis-interaction of Mac-1 and Fc γ RIIA is a mean by which the immune system regulates neutrophil accumulation,

and a disruption of such process could have significant implications in inflammatory and autoimmune diseases. Other examples of receptor/ligand dyad interacting in a cis fashion exist and are reviewed in (42, 66). In investigating the cis versus trans interaction of the CD154 with the $\alpha 5\beta 1$ integrin, we demonstrated that membrane-bound CD154 interacting with the $\alpha 5\beta 1$ integrin, both expressed on the surface of the same cell, is capable of abolishing the apoptosis of this cell induced by Fas ligand, TNF- α or TRAIL. Both molecules are also shown to co-localize when expressed on the surface of the same cell. With respect to this latter point, it has been previously reported that co-localization of two molecules increases the possibility of a functional interaction between them (67). Our data thus indicate that membrane-bound CD154 is not capable of binding the $\alpha 5\beta 1$ in a trans-type of interaction, and is only capable of interacting with $\alpha 5\beta 1$ on cell surface in a cis-type of interaction. The biological significance of this phenomenon might be to sequester the available CD154 on the surface of activated T cells with the $\alpha 5\beta 1$ integrin enhancing the T cell survival while limiting the accessibility to trans-binding including its binding to the other receptors on other target cells, providing a certain form of immunological balance.

In summary, our study further outlines the immune/inflammatory signature of CD154 and adds to the list of roles this molecule can play in the pathogenesis of autoimmune diseases. A special attention was given to the newly discovered, and thus less visited CD154 receptors, namely the $\alpha 5\beta 1$ integrin. Our study highlights the biological significance of the CD154/ $\alpha 5\beta 1$ dyad more specifically in enhancing the survival and persistence of T cells, a phenomenon of high importance in inflammatory and autoimmune conditions such as RA and SLE.

Acknowledgements

This work was supported by a grant-in-aid from the Heart and Stroke Foundation of Canada.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- 1.Elgueta R, Benson MJ, de Vries VC, Wasiuk A, Guo Y, Noelle RJ. Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunological reviews*. 2009;229(1):10.1111/j.600-065X.2009.00782.x.
- 2.Hassan GS, Merhi Y, Mourad W. CD40 Ligand: A neo-inflammatory molecule in vascular diseases. *Immunobiology*. 2011;217(5):521-32.
- 3.Pietravalle F, Lecoanet Henchoz S, Blasey H, Aubry JP, Elson G, Edgerton MD, et al. Human native soluble CD40L is a biologically active trimer, processed inside microsomes. *J Biol Chem*. 1996;271(11):5965-7.
- 4.Jin Y, Nonoyama S, Morio T, Imai K, Ochs HD, Mizutani S. Characterization of soluble CD40 ligand released from human activated platelets. *J Med Dent Sci*. 2001;48(1):23-7.
- 5.Vakkalanka RK, Woo C, Kirou KA, Koshy M, Berger D, Crow MK. Elevated levels and functional capacity of soluble CD40 ligand in systemic lupus erythematosus sera. *Arthritis Rheum*. 1999;42(5):871-81.
- 6.Danese S, Sans M, Fiocchi C. The CD40/CD40L costimulatory pathway in inflammatory bowel disease. *Gut*. 2004;53(7):1035-43.
- 7.Kowal K, Pampuch A, Kowal-Bielecka O, Iacoviello L, Bodzenta-Lukaszyk A. Soluble CD40 ligand in asthma patients during allergen challenge. *J Thromb Haemost*. 2006;4(12):2718-20.
- 8.Ferro D, Pignatelli P, Loffredo L, Conti F, Valesini G, D'Angelo A, et al. Soluble CD154 plasma levels in patients with systemic lupus erythematosus: modulation by antiphospholipid antibodies. *Arthritis Rheum*. 2004;50(5):1693-4.

9. Tamura N, Kobayashi S, Kato K, Bando H, Haruta K, Oyanagi M, et al. Soluble CD154 in rheumatoid arthritis: elevated plasma levels in cases with vasculitis. *J Rheumatol*. 2001;28(12):2583-90.
10. Schonbeck U, Libby P. The CD40/CD154 receptor/ligand dyad. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2001;58(1):4-43.
11. Hassan GS, Rana M, Léveillé C, Nadiri A, Jundi M, Polyak M, et al. Implication of CD154/CD40 Interaction in Healthy and Autoimmune Responses. *Curr Immunol Rev*. 2009;5:285-99.
12. Brenner B, Koppenhoefer U, Grassme H, Kun J, Lang F, Gulbins E. Evidence for a novel function of the CD40 ligand as a signalling molecule in T-lymphocytes. *FEBS letters*. 1997;417:301-6.
13. Koppenhoefer U, Brenner B, Lang F, Gulbins E. The CD40-ligand stimulates T-lymphocytes via the neutral sphingomyelinase: a novel function of the CD40-ligand as signalling molecule. *FEBS letters*. 1997;414(2):444-8.
14. El Fakhry Y, Alturaihi H, Diallo D, Merhi Y, Mourad W. Critical role of lipid rafts in CD154-mediated T cell signaling. *Eur J Immunol*. 2010;40(3):770-9.
15. Alturaihi H, S. HG, Al-Zoobi L, Salti S, Darif Y, Yacoub D, et al. Interaction of CD154 with different receptors and its role in bidirectional signals. *Eur J Immunol*. 2015;45(2):592-602.
16. Life and breath: respiratory disease in Canada. Ontario: Ottawa; 2007.
17. Mewar D, Wilson AG. Autoantibodies in rheumatoid arthritis: a review. *Biomed Pharmacother*. 2006;60(10):648-55.
18. Yazdany J, Davis J. The role of CD40 ligand in systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2004;13(5):377-80.

- 19.Karnell JL, Albulescu M, Drabic S, Wang L, Moate R, Baca M, et al. A CD40L-targeting protein reduces autoantibodies and improves disease activity in patients with autoimmunity. *Science translational medicine*. 2019;11(489).
- 20.Perper SJ, Westmoreland SV, Karman J, Twomey R, Seagal J, Wang R, et al. Treatment with a CD40 Antagonist Antibody Reverses Severe Proteinuria and Loss of Saliva Production and Restores Glomerular Morphology in Murine Systemic Lupus Erythematosus. *J Immunol*. 2019;203(1):58-75.
- 21.Andre P, Prasad KS, Denis CV, He M, Papalia JM, Hynes RO, et al. CD40L stabilizes arterial thrombi by a beta3 integrin--dependent mechanism. *Nat Med*. 2002;8(3):247-52.
- 22.Zirlik A, Maier C, Gerdes N, MacFarlane L, Soosairajah J, Bavendiek U, et al. CD40 ligand mediates inflammation independently of CD40 by interaction with Mac-1. *Circulation*. 2007;115(12):1571-80.
- 23.Leveille C, Bouillon M, Guo W, Bolduc J, Sharif-Askari E, El-Fakhry Y, et al. CD40 Ligand Binds to $\alpha 5\beta 1$ Integrin and Triggers Cell Signaling. *J Biol Chem*. 2007;282(8):5143-51.
- 24.Takada YK, Yu J, Shimoda M, Takada Y. Integrin Binding to the Trimeric Interface of CD40L Plays a Critical Role in CD40/CD40L Signaling. *J Immunol*. 2019;203(5):1383-91.
- 25.Andre P, Nannizzi-Alaimo L, Prasad SK, Phillips DR. Platelet-derived CD40L: the switch-hitting player of cardiovascular disease. *Circulation*. 2002;106(8):896-9.
- 26.Okwor I, Jia P, Uzonna JE. Interaction of Macrophage Antigen 1 and CD40 Ligand Leads to IL-12 Production and Resistance in CD40-Deficient Mice Infected with *Leishmania major*. *J Immunol*. 2015;195(7):3218-26.

- 27.El Fakhry Y, Alturaihi H, Yacoub D, Liu L, Guo W, Leveille C, et al. Functional Interaction of CD154 Protein with alpha5beta1 Integrin Is Totally Independent from Its Binding to alpha1Ibbeta3 Integrin and CD40 Molecules. *J Biol Chem*. 2012;287(22):18055-66.
- 28.Loubaki L, Semlali A, Boisvert M, Jacques E, Plante S, Aoudjit F, et al. Crosstalk between T cells and bronchial fibroblasts obtained from asthmatic subjects involves CD40L/alpha 5 beta 1 interaction. *Mol Immunol*. 2010;47(11-12):2112-8.
- 29.Bachsais M, Naddaf N, Yacoub D, Salti S, Alaaeddine N, Aoudjit F, et al. The Interaction of CD154 with the alpha5beta1 Integrin Inhibits Fas-Induced T Cell Death. *PLoS One*. 2016;11(7):e0158987.
- 30.Benslimane N, Hassan GS, Yacoub D, Mourad W. Requirement of transmembrane domain for CD154 association to lipid rafts and subsequent biological events. *PLoS One*. 2012;7(8):e43070.
- 31.Lee MW, Kim DS, Eom JE, Ko YJ, Sung KW, Koo HH, et al. RAD001 (everolimus) enhances TRAIL cytotoxicity in human leukemic Jurkat T cells by upregulating DR5. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015;463(4):894-9.
- 32.Elia A, Powley IR, MacFarlane M, Clemens MJ. Modulation of the sensitivity of Jurkat T-cells to inhibition of protein synthesis by tumor necrosis factor alpha-related apoptosis-inducing ligand. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*. 2014;34(10):769-77.
- 33.Shakibaei M, Sung B, Sethi G, Aggarwal BB. TNF-alpha-induced mitochondrial alterations in human T cells requires FADD and caspase-8 activation but not RIP and caspase-3 activation. *Antioxid Redox Signal*. 2010;13(6):821-31.

34. Anel A, Martinez-Lostao L. APO2L/TRAIL: new insights in the treatment of autoimmune disorders. Recent patents on inflammation & allergy drug discovery. 2011;5(3):184-99.
35. Clark J, Vagenas P, Panesar M, Cope AP. What does tumour necrosis factor excess do to the immune system long term? Ann Rheum Dis. 2005;64 Suppl 4:iv70-6.
36. Moudgil KD, Choubey D. Cytokines in autoimmunity: role in induction, regulation, and treatment. Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research. 2011;31(10):695-703.
37. Brinkmann V, Kinzel B, Kristofic C. TCR-independent activation of human CD4⁺ 45RO⁻ T cells by anti-CD28 plus IL-2: Induction of clonal expansion and priming for a Th2 phenotype. J Immunol. 1996;156(11):4100-6.
38. Ford GS, Barnhart B, Shone S, Covey LR. Regulation of CD154 (CD40 ligand) mRNA stability during T cell activation. J Immunol. 1999;162(7):4037-44.
39. Larson MK, Watson SP. Regulation of proplatelet formation and platelet release by integrin alpha IIb beta3. Blood. 2006;108(5):1509-14.
40. Georgopoulos NT, Steele LP, Thomson MJ, Selby PJ, Southgate J, Trejdosiewicz LK. A novel mechanism of CD40-induced apoptosis of carcinoma cells involving TRAF3 and JNK/AP-1 activation. Cell Death Differ. 2006;13(10):1789-801.
41. Bugajska U, Georgopoulos NT, Southgate J, Johnson PW, Graber P, Gordon J, et al. The effects of malignant transformation on susceptibility of human urothelial cells to CD40-mediated apoptosis. J Natl Cancer Inst. 2002;94(18):1381-95.

- 42.Held W, Mariuzza RA. Cis-trans interactions of cell surface receptors: biological roles and structural basis. Cellular and molecular life sciences : CMLS. 2011;68(21):3469-78.
- 43.Thelen M, Wymann MP, Langen H. Wortmannin binds specifically to 1-phosphatidylinositol 3-kinase while inhibiting guanine nucleotide-binding protein-coupled receptor signaling in neutrophil leukocytes. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994;91(11):4960-4.
- 44.Powis G, Bonjouklian R, Berggren MM, Gallegos A, Abraham R, Ashendel C, et al. Wortmannin, a potent and selective inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase. Cancer Res. 1994;54(9):2419-23.
- 45.Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. Cell. 2002;110(6):673-87.
- 46.Doucey MA, Legler DF, Faroudi M, Boucheron N, Baumgaertner P, Naeher D, et al. The beta1 and beta3 integrins promote T cell receptor-mediated cytotoxic T lymphocyte activation. J Biol Chem. 2003;278(29):26983-91.
- 47.Eguchi K. Apoptosis in autoimmune diseases. Intern Med. 2001;40(4):275-84.
- 48.Cope AP, Schulze-Koops H, Aringer M. The central role of T cells in rheumatoid arthritis. Clinical and experimental rheumatology. 2007;25(5 Suppl 46):S4-11.
- 49.Severson C, Hafler DA. T-cells in multiple sclerosis. Results and problems in cell differentiation. 2010;51:75-98.
- 50.Kaskow BJ, Baecher-Allan C. Effector T Cells in Multiple Sclerosis. Cold Spring Harbor perspectives in medicine. 2018;8(4).
- 51.Di Sabatino A, Corazza GR. Coeliac disease. Lancet. 2009;373(9673):1480-93.
- 52.Suarez-Fueyo A, Bradley SJ, Tsokos GC. T cells in Systemic Lupus Erythematosus. Current opinion in immunology. 2016;43:32-8.

- 53.Lin YP, Su CC, Huang JY, Lin HC, Cheng YJ, Liu MF, et al. Aberrant integrin activation induces p38 MAPK phosphorylation resulting in suppressed Fas-mediated apoptosis in T cells: implications for rheumatoid arthritis. *Mol Immunol*. 2009;46(16):3328-35.
- 54.Nakayamada S, Saito K, Nakano K, Tanaka Y. Activation signal transduction by beta1 integrin in T cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2007;56(5):1559-68.
- 55.Kawai M, Masuda A, Kuwana M. A CD40-CD154 interaction in tissue fibrosis. *Arthritis Rheum*. 2008;58(11):3562-73.
- 56.Henn V, Steinbach S, Buchner K, Presek P, Kroczeck RA. The inflammatory action of CD40 ligand (CD154) expressed on activated human platelets is temporally limited by coexpressed CD40. *Blood*. 2001;98(4):1047-54.
- 57.Hassan GS, Yacoub D, Alaaeddine N, Nadiri A, Merhi Y, Mourad W. CD154: the atherosclerotic risk factor in rheumatoid arthritis? *Arthritis Research & Therapy*. 2013;15(1):206-.
- 58.Prasad KS, Andre P, He M, Bao M, Manganello J, Phillips DR. Soluble CD40 ligand induces beta3 integrin tyrosine phosphorylation and triggers platelet activation by outside-in signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(21):12367-71. Epub 2003 Sep 30.
- 59.Razi N, Varki A. Masking and unmasking of the sialic acid-binding lectin activity of CD22 (Siglec-2) on B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(13):7469-74.
- 60.Collins BE, Blixt O, DeSieno AR, Bovin N, Marth JD, Paulson JC. Masking of CD22 by cis ligands does not prevent redistribution of CD22 to sites of cell contact. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(16):6104-9.

61. Jin L, McLean PA, Neel BG, Wortis HH. Sialic acid binding domains of CD22 are required for negative regulation of B cell receptor signaling. *J Exp Med*. 2002;195(9):1199-205.
62. Doucey MA, Scarpellino L, Zimmer J, Guillaume P, Luescher IF, Bron C, et al. Cis association of Ly49A with MHC class I restricts natural killer cell inhibition. *Nat Immunol*. 2004;5(3):328-36.
63. Back J, Chalifour A, Scarpellino L, Held W. Stable masking by H-2Dd cis ligand limits Ly49A relocalization to the site of NK cell/target cell contact. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(10):3978-83.
64. Andersson KE, Williams GS, Davis DM, Hoglund P. Quantifying the reduction in accessibility of the inhibitory NK cell receptor Ly49A caused by binding MHC class I proteins in cis. *Eur J Immunol*. 2007;37(2):516-27.
65. Saggu G, Okubo K, Chen Y, Vattepu R, Tsuboi N, Rosetti F, et al. Cis interaction between sialylated FcγRIIA and the αI-domain of Mac-1 limits antibody-mediated neutrophil recruitment. *Nature communications*. 2018;9(1):5058.
66. Nitschke L. CD22 and Siglec-G: B-cell inhibitory receptors with distinct functions. *Immunol Rev*. 2009;230(1):128-43.
67. Brummer J, Ebrahimnejad A, Flayeh R, Schumacher U, Loning T, Bamberger AM, et al. cis Interaction of the cell adhesion molecule CEACAM1 with integrin β3. *Am J Pathol*. 2001;159(2):537-46.

Figure 1

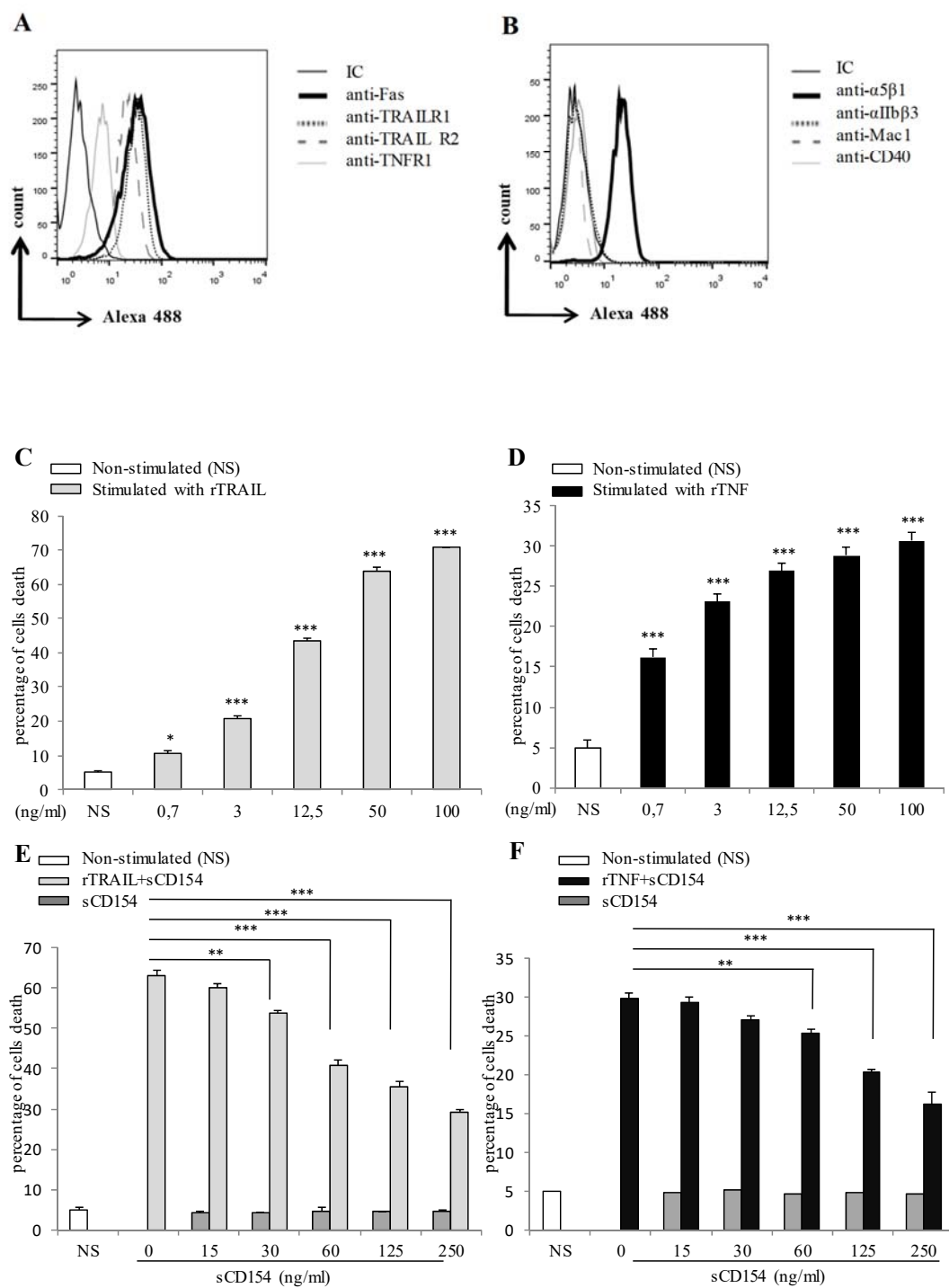


Figure 2

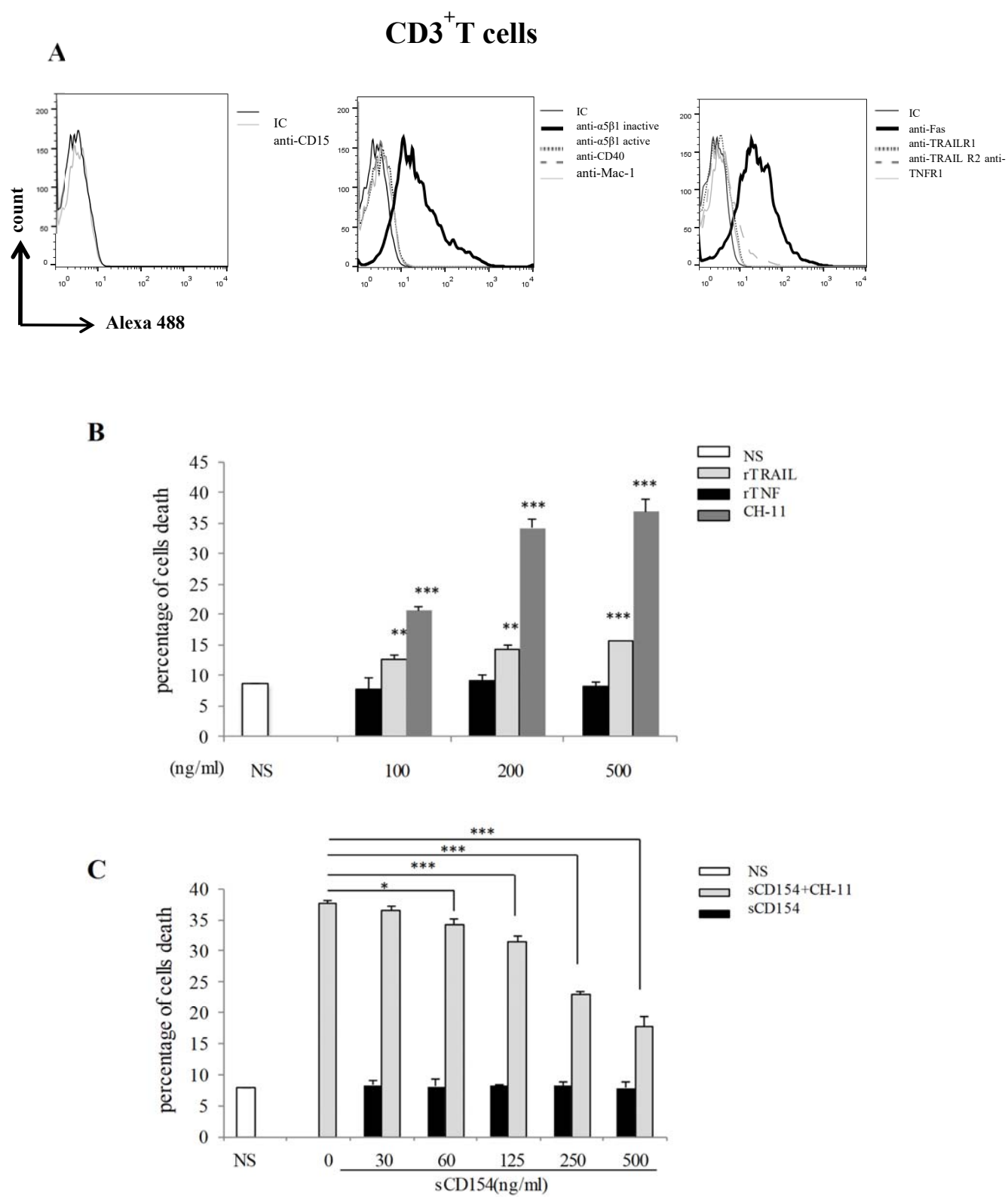


Figure 3

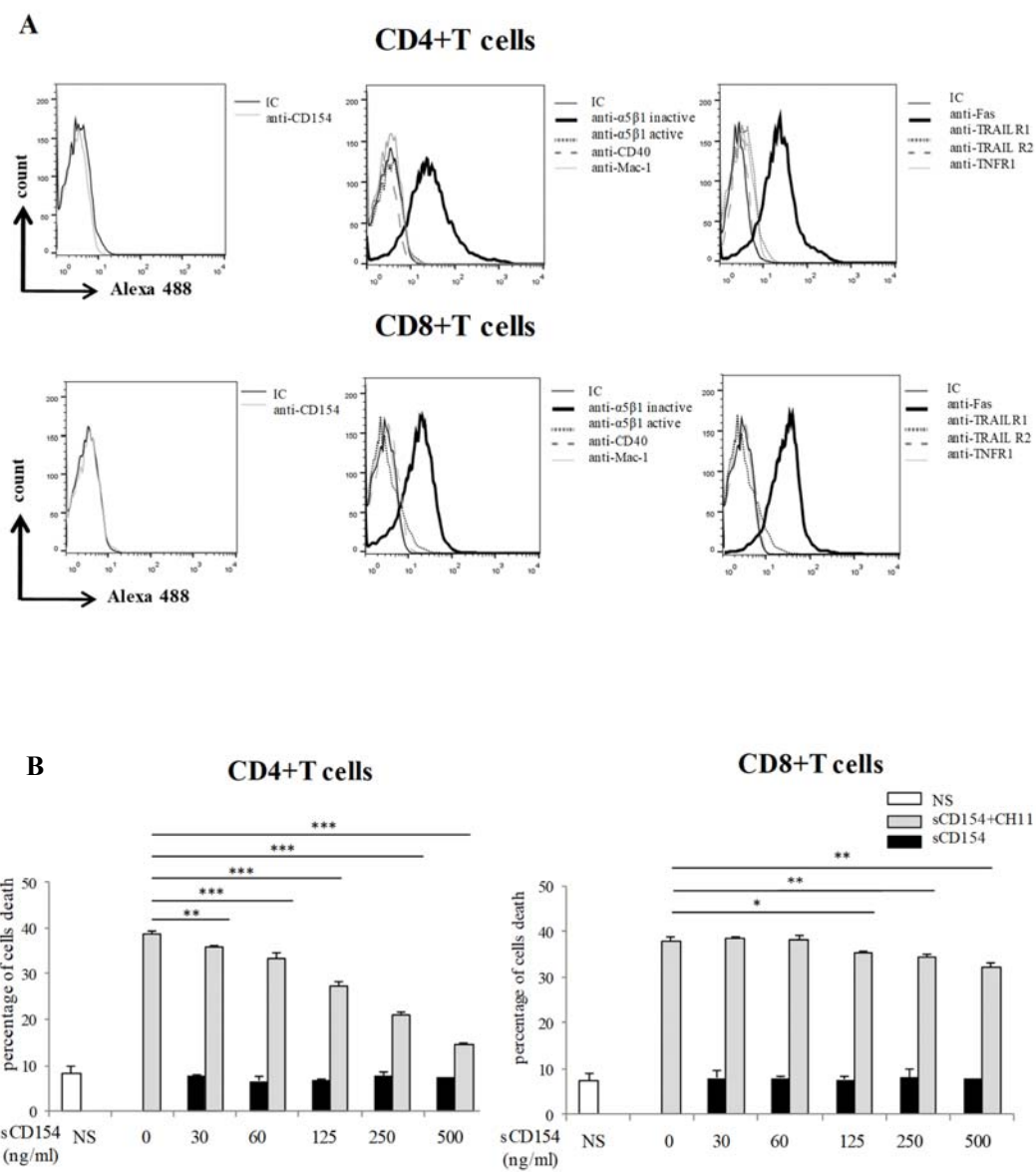


Figure 4

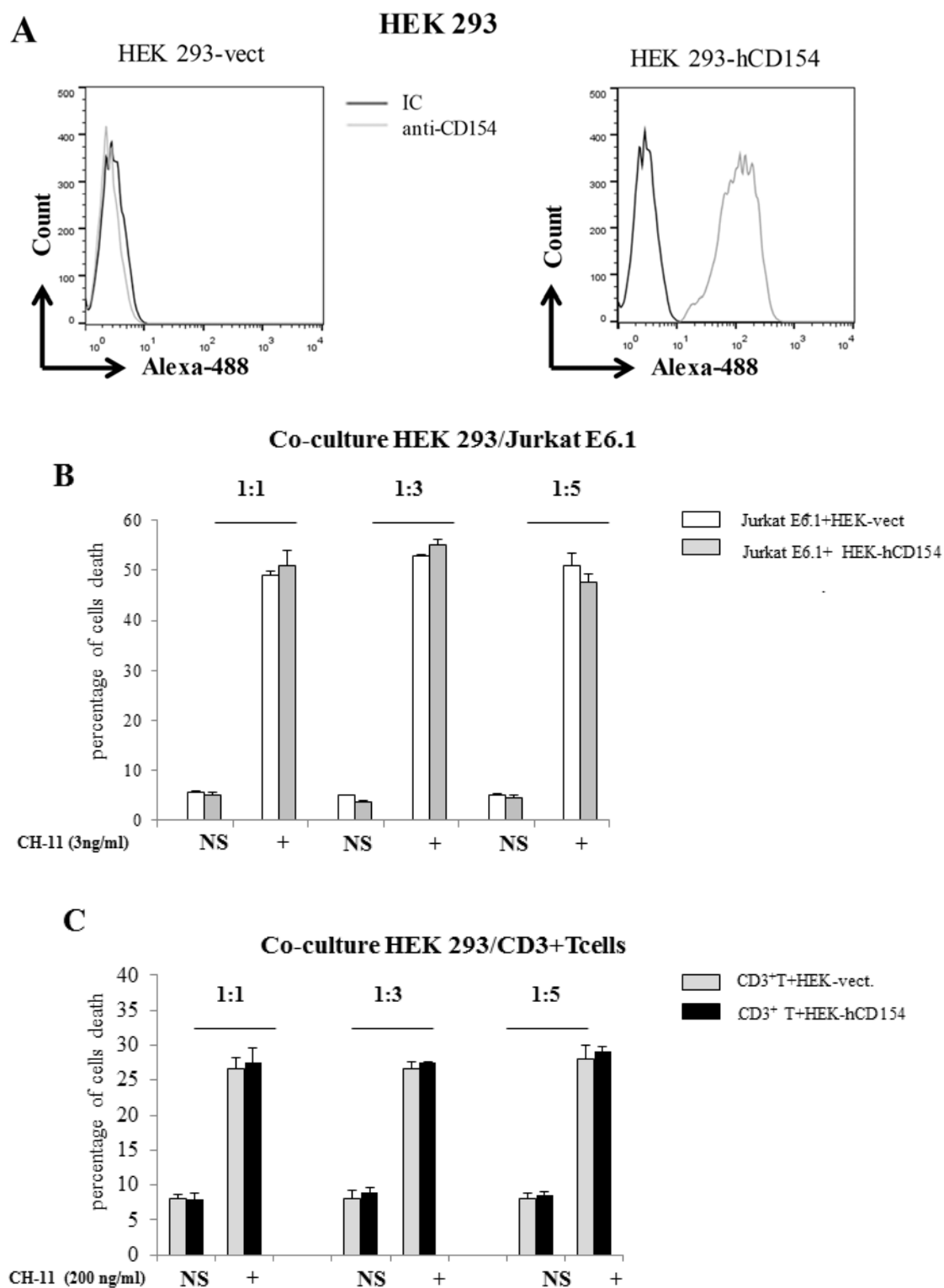


Figure 5

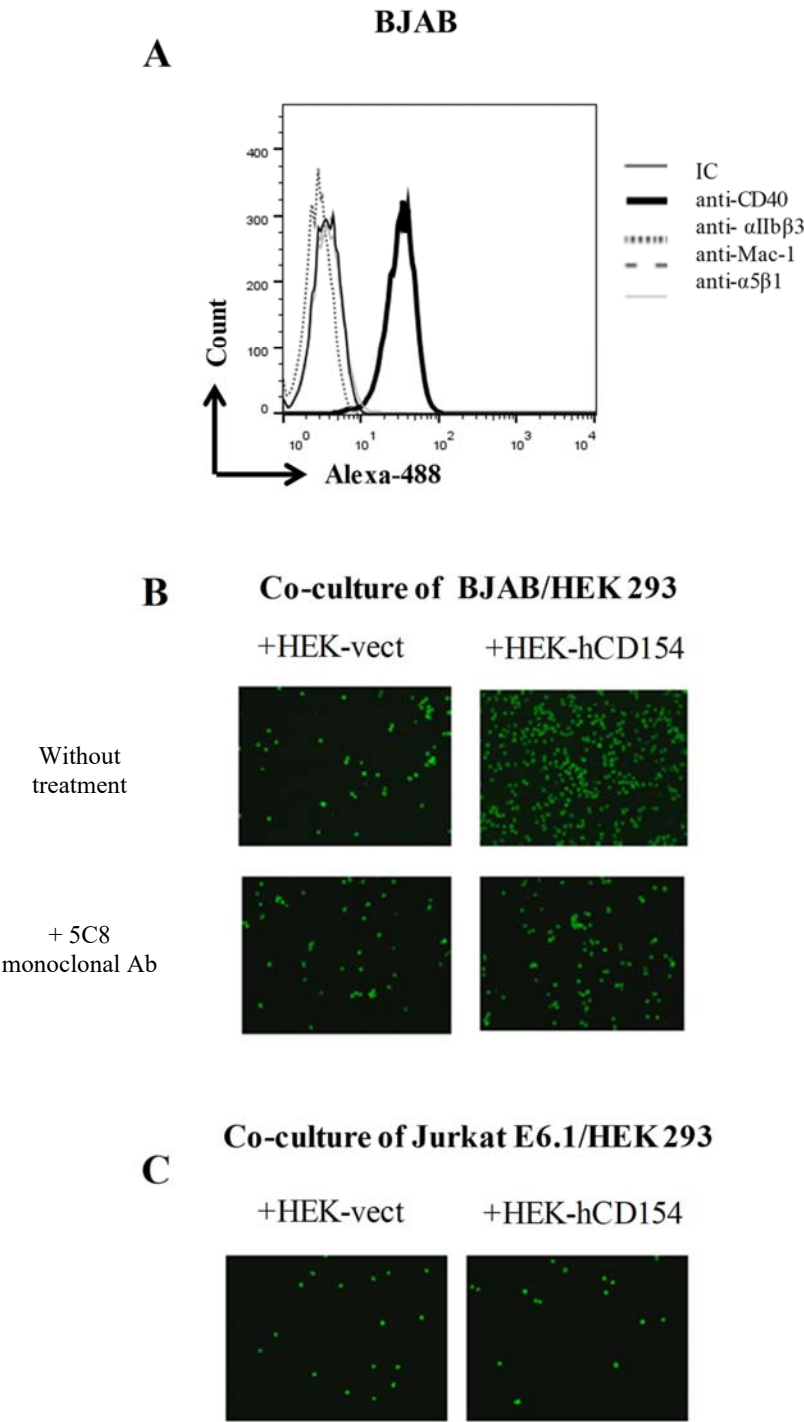


Figure 6

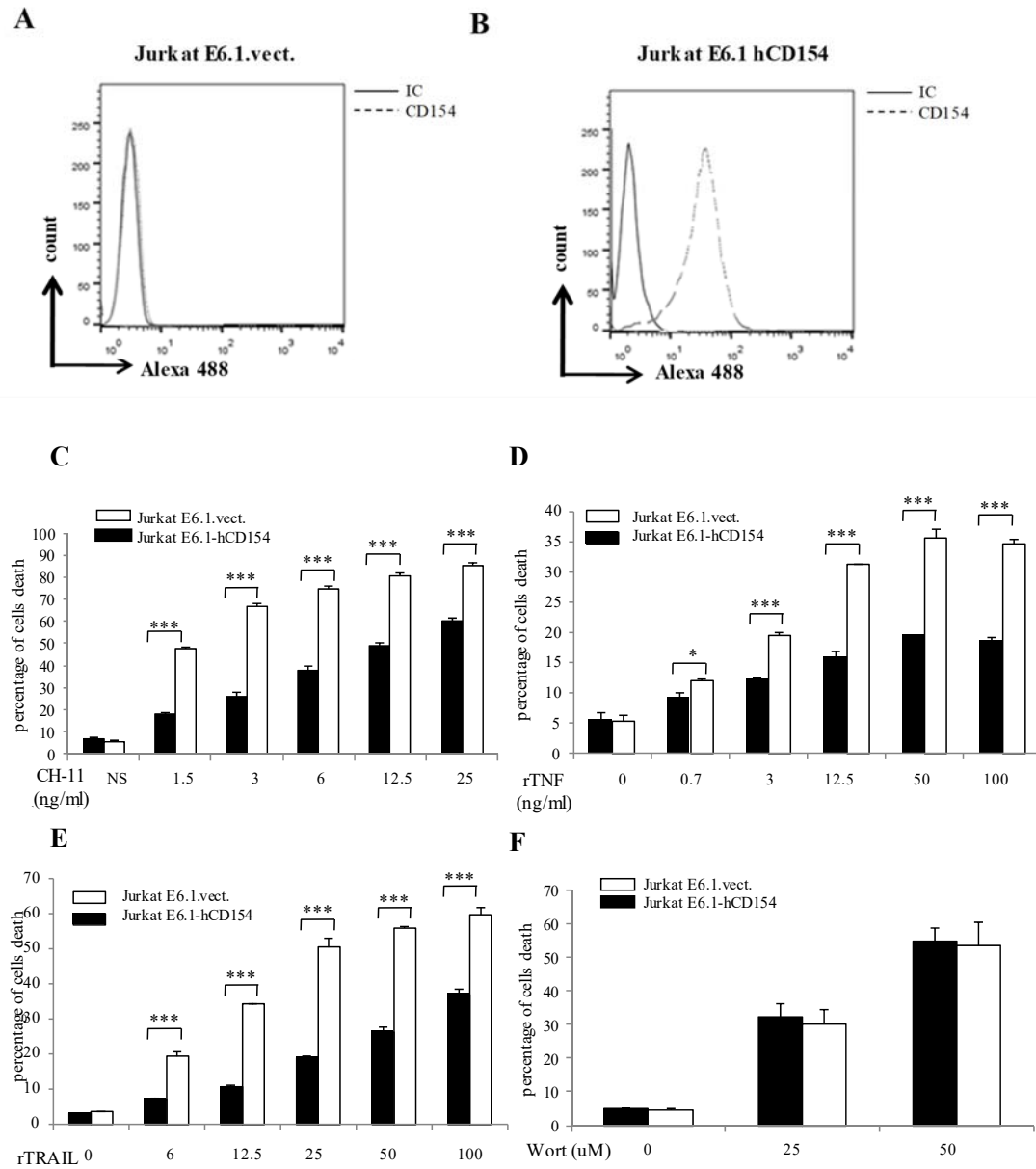
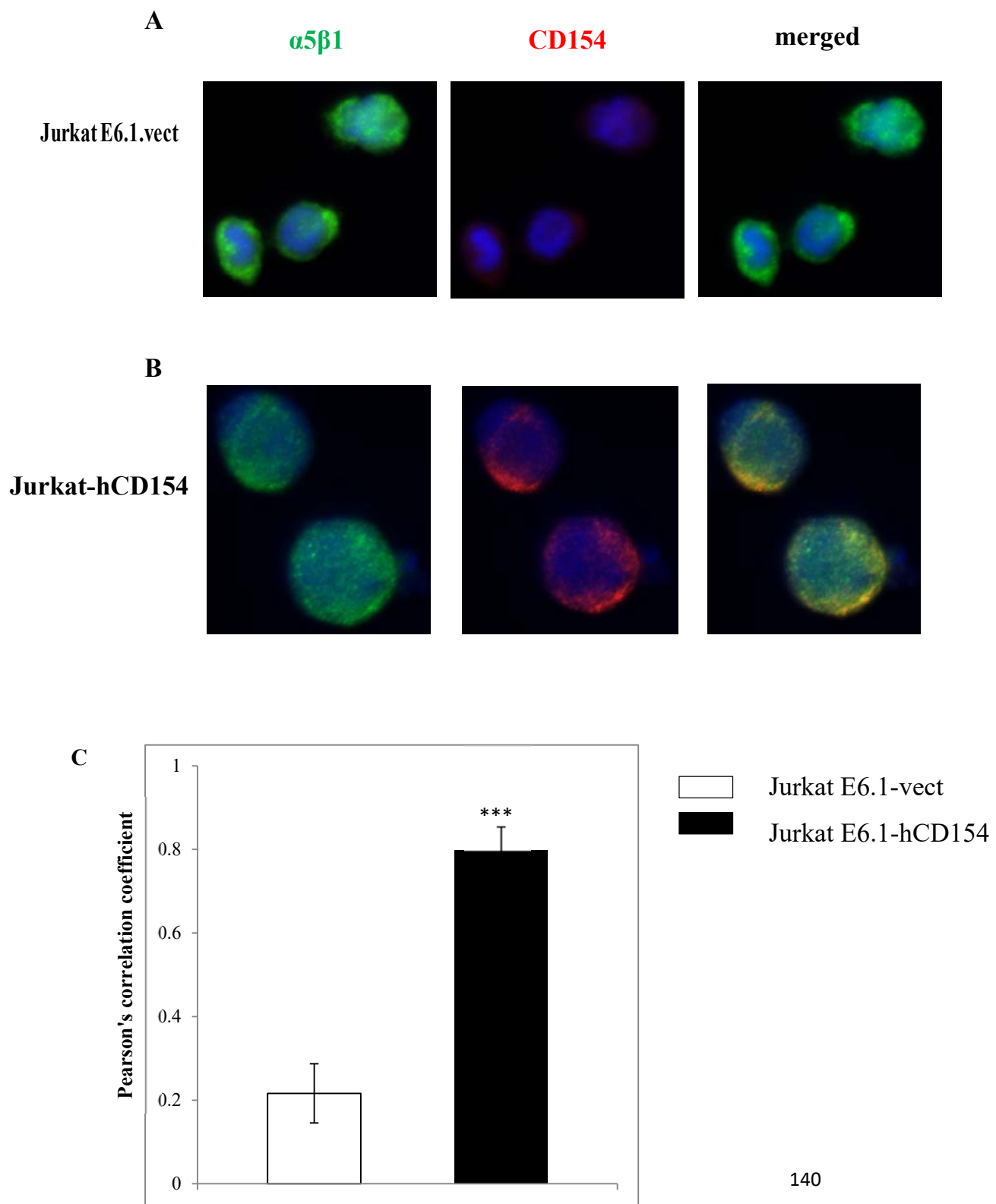


Figure 7



Figures Legends

Fig 1. Soluble CD154 inhibits TRAIL- and TNF- α -mediated cell death in Jurkat E6.1 cells. (A, B) Cells were incubated with anti-TNF-R1 mAb (H398), anti-TRAIL-R1 mAb (C69036), anti-TRAIL-R2 mAb (C71908), anti- α 5 β 1 integrin mAb (JBS5), anti- α M β 2 mAb (ICRF44), anti- α IIb β 3 mAb (A2A9/6), anti-CD40 mAb (G28.5) or isotype IgGs followed by goat anti-mouse IgG-Alexa488. The expression of the corresponding molecule on cell surface was analysed by FACS Calibur. (C, D) *Cell death response of Jurkat E6.1 cells stimulated with TRAIL or TNF- α* Jurkat E6.1 T cells were stimulated or not (NS) with different concentrations of recombinant TRAIL (rTRAIL) (C) or rTNF- α (D) for 18 hours at 37°C and assessed for their cell death response by FACS analysis as the percentage of death obtained by propidium iodide staining. Statistical testing compared cells stimulated with rTRAIL or rTNF- α with NS cells. (E, F) *Soluble CD154 inhibition of Jurkat T cell death.* T cells were pre-treated with different concentrations of sCD154 for 6h, then left non-stimulated (NS) or stimulated with sub-optimal concentration of rTRAIL (50 ng/ml) (E) or rTNF- α (12ng/ml) (F) for 18 hours at 37°C and assessed for their cell death response by FACS analysis. Results represent mean values \pm SD and are representative of at least 5 independent experiments (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Fig 2. Soluble CD154 inhibits Fas-mediated cell death in human activated CD3⁺ T cells. (A) *Expression of α 5 β 1, CD40, Mac-1, Fas and TRAIL and TNF receptors in human activated T cells.* T cells were isolated into CD3⁺ cells and activated with PHA/IL-2 for 6 days. Cells were then incubated with anti-CD154 (C4) (left panel), anti- α 5 β 1 (JBS5 and B44), anti-CD40 (G28.5) and anti-Mac-1(ICRF44) (middle panel), and anti-Fas (LOB3/17), anti-TRAIL-R1 (C69036), anti-TRAIL-R2 (C71908) and anti-TNF-R1 (H398) (right panel) mAbs or the corresponding isotype IgGs followed by goat anti-mouse IgG-Alexa488 staining and evaluated for expression of the corresponding molecule on cell surface by FACS analysis. (B) *Cell death response of CD3⁺ T cells stimulated with anti-Fas, TRAIL or TNF.* Activated CD3⁺ T cells were left non-stimulated (NS) or stimulated with different

concentrations of rTRAIL, rTNF or CH-11 (anti-Fas) for 24 hours at 37°C and assessed for cell death response by FACS analysis as the percentage of death obtained by propidium iodide staining. Statistical testing compared cells stimulated with *rTRAIL*, *rTNF-α* or *CH-11* with NS cells. **(C) Soluble CD154 inhibition of Fas-induced human CD3⁺ T cell death.** Activated CD3⁺ T cells were pre-treated with different concentrations of sCD154 for 6h, then left non-stimulated (NS) or stimulated with the CH-11 mAb (200ng/ml) for 24h at 37°C. Cell death was then evaluated using propidium iodide by FACS. Results represent mean values ±SD and are representative of 5 independent experiments performed with T cells isolated from 5 different blood donors (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Fig 3. Soluble CD154 inhibits Fas-mediated cell death more importantly in human activated CD4⁺ T cells than CD8⁺ ones. **(A) Expression of α5β1, CD40, Mac-1, Fas, TRAIL and TNF receptors in human activated CD4⁺ and CD8⁺ T cells.** T cells were isolated by negative selection into CD4⁺ T cells and activated with PHA/IL-2 for 6 days. Cells were then incubated with anti-CD154 (C4) (*left panels*), anti-α5β1 (JBS5 and B44), anti-CD40 (G28.5) and anti-Mac-1 (ICRF44) (*middle panels*), and anti-Fas (LOB3/17), anti-TRAIL-R1 (C69036), anti-TRAIL-R2 (C71908) and anti-TNF-R1 (H398) (*right panels*) mAbs or the corresponding isotype IgGs followed by goat anti-mouse IgG-Alexa488 staining and evaluated for expression of the corresponding molecule on cell surface by FACS analysis. **(B) Soluble CD154 inhibition of Fas-induced- CD4⁺ and -CD8⁺ T cell death.** Activated CD4⁺ and CD8⁺ T cells were pre-treated with different concentrations of sCD154 for 6h, then left non-stimulated (NS) or stimulated with the CH-11 mAb for 24h at 37°C. Cell death was then evaluated using propidium iodide by FACS. Results represent mean values ±SD and are representative of 5 independent experiments performed with T cells isolated from 5 different blood donors (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Fig 4. Interaction of membrane-bound CD154 with integrin α5β1 does not inhibit Fas-mediated cell death in Jurkat E6.1 cells and human T cells. **(A)** HEK 293 cells were stably transfected with human CD154 (HEK 293-hCD154) or empty vector (HEK 293-vect.). Cells were incubated with anti-CD154 C4 or the

corresponding isotype IgGs followed by goat anti-mouse IgG-Alexa488 staining and evaluated for CD154 expression on cell surface by FACS analysis. **(B-C) Cell death response of Jurkat E6.1 cells and human T cells stimulated with Fas ligand in the presence or absence of membrane-bound CD154.** **(B)** Jurkat E6.1-NT cells and **(C)** human T cells were co-cultured with HEK 293-vect. or HEK 293-hCD154 using different cell/cell ratios (1:1, 1:3 and 1:5) for 6h at 37°C and stimulated with constant concentrations of anti-CH-11 (3ng/ml or 200ng/ml respectively) for 18 hours at 37°C. Cell death response was determined by FACS analysis as the percentage of death obtained by propidium iodide staining. Results represent mean values \pm SD and are representative of at least 5 independent experiments.

Fig 5. Jurkat E6.1 cells do not adhere to CD154-transfected HEK 293. **(A) Expression of $\alpha 5\beta 1$, CD40, Mac-1 and α IIb β 3 receptors on BJAB cells.** BJAB cells were incubated with anti- $\alpha 5\beta 1$ (JBS5 and B44), anti-CD40 (G28.5), anti-Mac-1 (ICRF44) and anti- α IIb β 3 (A2A9/6) mAbs or the corresponding isotype IgGs followed by goat anti-mouse IgG-Alexa488 staining and evaluated for expression of the corresponding molecule on cell surface by FACS analysis. **(B, C) Adherence of Jurkat E6.1 or BJAB cells to CD154-transfected HEK 293.** **(B)** BJAB cells were labelled with CFSE and treated or not with the anti-CD154 mAb, 5C8 before being co-cultured with HEK 293-vect. or with CD154-transfected HEK 293 (HEK 293-hCD154) for 5min at 37°C. Scale bar = 100 μ m. **(C)** Jurkat E6.1-NT cells were labelled with CFSE then co-cultured with HEK 293-vect. or with HEK 293-hCD154 for 5min at 37°C. The adherence of Jurkat E6.1 or BJAB cells to HEK293-hCD154 was analyzed by fluorescence microscopy. Scale bar in **(B)** = 100 μ m and in **(C)** = 20 μ m. Results represent mean values \pm SD and are representative of at least 5 independent experiments.

Fig 6. CD154 expression on the surface of Jurkat E6.1 cells inhibits their Fas-, TRAIL- and TNF-mediated death response. **(A, B)** Jurkat E6.1 cells were stably transfected with human CD154 (Jurkat E6.1-hCD154) or empty vector (Jurkat E6.1-vect.). Cells were then incubated with anti-CD154 (C4) mAbs or the corresponding isotype IgGs followed by goat anti-mouse IgG-Alexa488 staining and evaluated for expression of CD154 on cell surface by FACS analysis. **(C, D, E) Cell death**

response of CD154-transfected-Jurkat T cells stimulated with Fas ligand, TRAIL or TNF- α . Jurkat E6.1-hCD154 and Jurkat E6.1-vect. T cells were stimulated with anti-Fas (**C**), rTNF- α (**D**) or rTRAIL (**E**) for 18 hours at 37°C and assessed for their cell death response by FACS analysis as the percentage of death obtained by propidium iodide staining. (**F**) **Cell death response of CD154-transfected-Jurkat T cells stimulated with a survival inhibitor.** Jurkat E6.1-hCD154 and Jurkat E6.1-vect. T cells were stimulated with Wortmannin for 18 hours at 37°C and assessed for their cell death response by FACS analysis. Results represent mean values \pm SD and are representative of at least 5 independent experiments (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Fig 7. Cis association between membrane-bound CD154 and $\alpha 5\beta 1$ on the surface of the same cell. (**A, B**) Jurkat E6.1-vect. (**A**) and Jurkat E6.5-hCD154 (**B**) cells were fixed in PFA and permeabilized in Triton before the addition of sCD40-Fc-biotinylated followed by streptavidin PE, to mark CD154 molecules in red and JBS5 followed by GAM-Alexa488 to mark the $\alpha 5\beta 1$ integrin in green. DNA was counterstained with Hoechst dye. Images were recorded with a microscope (ApoTome.2, Observer. Z1; Carl Zeiss, Inc.) and driven by AxioVision LE software (Carl Zeiss, Inc.). (**C**) Quantification of co-localization sites. Co-localization between the integrin (red) and CD154 (green) was represented as Pearson's correlation coefficient and measured in individual Jurkat cells. Scale bars in (**A, B**) = 10 μ m. Results represent mean values \pm SD and are representative of 3 independent experiments (*** $p < 0.001$).

5. Discussion

Le CD154, est un régulateur important de la réponse immunitaire. Son interaction avec son principal récepteur le CD40, s'est avérée jouer un rôle majeur dans la pathogenèse de plusieurs maladies auto-immunes et inflammatoires étant donné l'expression quasi ubiquitaire du CD154 et du CD40 sur les cellules immunitaires [13]. Depuis quelques années, des études ont montré que d'autres récepteurs tels que : α IIb β 3, α M β 2, α v β 3 et α 5 β 1 appartenant à la famille des intégrines, pouvaient interagir avec le CD154 [60, 61, 62]. Cette découverte ajoute davantage de complexité aux divers rôles auxquels le CD154 participe. Les intégrines sont connues pour jouer un rôle dans le contrôle de nombreux processus cellulaires tels que l'adhérence, la migration, la prolifération, la différenciation et l'apoptose cellulaire suite à leurs interactions avec leurs ligands naturels [64, 65]. Cependant, le rôle biologique de l'interaction du CD154 avec ses récepteurs nouvellement identifiés reste peu étudié, d'où l'objectif de cette étude.

Les principaux résultats générés dans ce projet montrent que le sCD154 est capable d'interagir avec l'intégrine α 5 β 1 exprimée par les cellules T, et que cette interaction inhibe l'apoptose cellulaire induite par Fas dans les lignées de cellules T Jurkat E6.1 et HUT-78 suite à l'inhibition du clivage de la caspase-8. Nous avons également montré que l'effet anti-apoptotique induit par l'axe CD154/ α 5 β 1 n'était pas restreint au Fas seulement, mais était généralisé aux autres récepteurs de mort de la famille des TNF tel que le TRAIL et le TNF. Plus intéressant encore, nos résultats ont montré que la pré-incubation avec le sCD154 des cellules T humaines TCD3⁺ préalablement activées et exprimant seulement à leur surface la forme inactive de α 5 β 1, protège ces dernières de la mort induite par Fas. De plus, nous avons montré que cette inhibition de la mort était plus importante dans les cellules T CD4⁺ comparée aux cellules T CD8⁺. Enfin, nous avons montré que comme le sCD154, le mCD154 était capable d'inhiber la mort induite via les différents récepteurs de mort Fas, TRAIL et TNF, mais seulement par un mécanisme cis-dépendant lorsque le CD154 et l'intégrine α 5 β 1 sont exprimés à la surface d'une même cellule.

Les lymphocytes T sont au centre de la pathogenèse des maladies auto-immunes. Il a été démontré que les cellules T des patients atteints du lupus et de polyarthrite chronique expriment fortement l'intégrines β 1 [321, 322]. Par ailleurs, d'autres

travaux ont démontré que les intégrines, et en particulier les intégrines $\beta 1$, suite à leurs interactions avec leurs ligands naturels, inhibent les événements apoptotiques dans les cellules T de nature normale ou maligne. Dans ce projet, nous avons voulu étudier le rôle de l'interaction CD154/ $\alpha 5\beta 1$ dans le phénomène d'apoptose des cellules T.

Les lignées lymphocytaires T Jurkat E6.1 et HUT-78 ainsi que les cellules T humaines ont principalement été utilisées dans cette étude. Les lignées cellulaires choisies représentent un bon modèle pour étudier l'interaction $\alpha 5\beta 1$ /CD154 sur les cellules T. Ces dernières comme les cellules T humaines expriment exclusivement l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ sous sa forme inactive qui, comme décrit plus haut, est la seule conformation de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ qui peut interagir avec le CD154. Ces cellules T étaient négatives pour l'expression des autres récepteurs du CD154, le CD40, le Mac-1 et l' $\alpha \text{IIb}\beta 3$. Étant donné que la liaison du CD154 à l' $\alpha 5\beta 1$ a été montrée à la surface des lignées monocytaires U937, il était primordial pour nous de démontrer en premier la spécificité de liaison CD154/ $\alpha 5\beta 1$ sur les cellules T.

Nos résultats ont démontré que le sCD154 était capable de se lier spécifiquement à l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et que cette interaction était indépendante des résidus du CD154 qui sont impliqués dans l'interaction avec le CD40. L'interaction CD154/ $\alpha 5\beta 1$ a été montrée induire l'activation des voies de signalisation MAPK (Erk1/2) dans les cellules U937 [61]. Par ailleurs, l'interaction de l'intégrine $\beta 1$ avec ses ligands naturels induit également l'activation des voies de signalisation MAPK (p38/ERK1/2) mais également PI3-K/Akt [139, 169, 172, 234]. Dans cette étude, nous avons montré que l'engagement du CD154 avec l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ exprimée au niveau des cellules T Jurkat E6.1 était également capable d'activer ces mêmes voies de signalisation MAPK (p38/ERK1/2) et PI3-K/Akt. Il a été rapporté que l'activation de ses voies de signalisation au niveau des cellules B suite à une interaction CD154/CD40 induisait l'activation et la prolifération de ces cellules [3, 39]. La capacité du sCD154 à induire une signalisation intracellulaire dans les cellules T suite à son interaction spécifique avec la forme inactive de $\alpha 5\beta 1$ dévoile une nouvelle voie de signalisation d'une grande importance dans la fonction des cellules T.

Plusieurs travaux ont démontré l'implication des voies de signalisation MAPK (p38/ERK1/2) et PI3-K/Akt dans une réponse antiapoptotique au niveau des cellules T [233, 234, 235, 236, 237, 238]. En effet, il a été rapporté qu'au niveau des cellules T primaires, l'activation des voies de signalisation MAPK et PI3-K augmente la survie des lymphocytes T en inhibant l'apoptose médiée par le récepteur Fas, cet effet était dû à la diminution de l'activité proapoptotique de la caspase-8 et des protéines Bid [236, 136]. Une autre étude a démontré que chez les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, l'engagement des intégrines $\beta 1$ induit l'activation de la voie p38 /MPAK. Cette activation augmente la survie lymphocytaire en inhibant le clivage de la caspase-8 [172, 188]. D'autres travaux ont rapporté que l'activation de la voie PI3K/Akt contribue efficacement à l'inhibition de l'apoptose des lymphocytes T induite via Fas [239, 240]. En effet, des protéines pro-apoptotiques comme Bad et la caspase-9 ont été considérées comme étant des substrats pour la protéine Akt et leur phosphorylation par cette dernière inhibe leur effet proapoptotique et augmente la survie cellulaire [239, 240].

Compte tenu de ces données, nous avons été très intéressés par rechercher si l'interaction CD154/ $\alpha 5\beta 1$ pouvait induire des signaux anti-apoptotiques et de survie dans les lymphocytes T. Nos résultats montrent que lorsque le CD154 interagit avec l'intégrine $\alpha 5\beta 1$, il est capable d'inhiber l'apoptose induite par Fas et cela dans les lignées de cellules T Jurkat E6.1 et HUT-78 par l'inhibition de la caspase-8. En effet, et en accord avec les études ci-dessus, la pré-incubation de ces cellules avec le sCD154 a complètement inhibé la mort induite via Fas dans les cellules T, indiquant que CD154 pourrait représenter un élément essentiel de la persistance et de la survie des cellules T lors des réponses inflammatoires et auto-immunes. Etant donné que les voies intrinsèques et extrinsèques interfèrent également avec le clivage de la caspase 8 qui clive la protéine Bid pour fournir le fragment "T-bid", qui interagit avec la mitochondrie et induit la libération du cytochrome C [156], il aurait été intéressant ici d'évaluer si l'interaction CD154/ $\alpha 5\beta 1$ était également capable d'inhiber le clivage de Bid et le relargage du cytochrome C, afin de voir l'implication de la voie intrinsèque dans la survie des cellules T.

Etant donné les résultats obtenus avec les lignées cellulaires T Jurkat E6.1 et HUT-78, nous avons été très intéressés par rechercher si l'interaction de l' $\alpha 5\beta 1$ avec le CD154 pourrait également induire des signaux de survie dans les lymphocytes T humains. Pour ce faire, nous avons utilisé des cellules T isolées à partir de PBMC de donneurs sains. En accord avec les études ci-dessus, la pré-incubation de ces cellules avec du sCD154 a inhibé la mort induite par Fas dans les cellules T CD3⁺ activées. Fait intéressant, l'inhibition de la mort a été plus importante dans la sous population de lymphocytes T CD4⁺ que T CD8⁺. Cette différence dans la réponse de mort peut être due aux niveaux plus élevés d'intégrine $\alpha 5\beta 1$ exprimés par les T CD4⁺ et au fait que l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ peut interagir avec plusieurs molécules de signalisation en aval, et donc différents mécanismes peuvent être impliqués dans la réponse de survie des T CD4⁺ et des TCD8⁺ [65, 163, 164, 166]. Le CD154 peut donc représenter un élément critique dans la survie des cellules T lors des réponses inflammatoires, faisant en sorte que l'interaction CD154/ $\alpha 5\beta 1$ pourrait être d'une haute importance dans la persistance des cellules T et la réponse proinflammatoire lors des maladies autoimmunes.

Durant la réponse immunitaire, la balance entre la survie et l'apoptose des cellules T constitue un mécanisme clé qui permet une régulation de la réponse immunitaire et le maintien de l'homéostasie cellulaire, prévenant ainsi le développement des maladies inflammatoires et autoimmunes. L'interaction CD154/ $\alpha 5\beta 1$ pourrait jouer un rôle important tant qu'au niveau physiologique que pathologique. En effet, lors de la réponse immunitaire, l'interaction CD154/ $\alpha 5\beta 1$ pourrait constituer un signal de survie qui permettrait aux cellules T de proliférer et de se différencier en cellules T effectrices, puis en cellules mémoires à la fin de la réponse immunitaire. Il a été rapporté que le CD154 est exprimé à la surface des cellules T activées pendant quelques heures, avant d'être clivé par les métallo-protéinases et retrouvé dans le liquide biologique sous forme soluble qui est biologiquement active [8, 9, 270]. On pourrait penser que le sCD154 pourrait interagir avec l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ à la surface des cellules T et exercer un effet anti-apoptotique qui permettrait aux cellules T d'exercer leur fonctions effectrices et de se différencier par la suite en cellules T mémoires.

Par ailleurs, l'interaction CD154/ $\alpha 5\beta 1$ pourrait également être considérée comme un régulateur néfaste qui permettrait aux cellules T de persister et de résister à l'apoptose induite par Fas, contribuant ainsi au maintien de l'environnement inflammatoire et au développement des maladies auto-immunes. En effet, l'apoptose des cellules T est un moyen par lequel notre système immunitaire régule ses réponses, en essayant de diminuer la charge des cellules T dans des conditions pathologiques telles que les maladies autoimmunes [25, 323]. Ainsi, en inhibant cette apoptose des cellules T, la dyade CD154 / $\alpha 5\beta 1$ contribue à la survie et à la persistance des cellules T en conditions inflammatoires. Lors de l'arthrite rhumatoïde, il a été rapporté que la survie des lymphocytes T ainsi que leur résistance à l'apoptose induite par Fas, augmentent l'accumulation et la persistance de ces cellules au niveau du liquide synovial [215]. Ce dernier a été considéré comme étant la source principale des signaux de survie des lymphocytes T. En plus, plusieurs études ont associé la sévérité de l'arthrite rhumatoïde à l'augmentation de la concentration du sCD154 au niveau du liquide synovial [215, 296]. Ceci suggère que la persistance, l'accumulation et la survie des cellules T au niveau des articulations enflammées peuvent être contrôlées en partie par l'effet du couple CD154/ $\alpha 5\beta 1$.

Nos résultats avaient montré que le signal de survie médié par le CD154 était davantage présent dans les sous-populations T CD4⁺. Ces dernières constituent une population de cellules très hétérogènes et plusieurs sous-populations de lymphocytes T ont été découvertes [324]. Chacune de ces sous populations est caractérisée par un rôle bien déterminé durant la réponse immunitaire, notamment les cellules Th1 et Th17 dont le rôle a été bien été documenté dans le développement des maladies auto-immunes tels que la polyarthrite rhumatoïde, la sclérose en plaques et d'autres [324, 325, 326]. De ce fait, il serait très intéressant d'évaluer la contribution du couple CD154/ $\alpha 5\beta 1$ dans la réponse spécifique de chacune de ces sous populations lymphocytaires.

Dans cette étude nous avons montré que l'interaction du CD154 avec l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ n'est pas spécifique à l'apoptose induite par le récepteur de mort Fas mais inhibe également l'apoptose induite par d'autres récepteurs de mort tels que TRAIL

et TNF- α . Fas a été le premier récepteur de mort identifié et de ce fait, le plus étudié [137]. Fas appartient à la superfamille des récepteurs du TNF (TNFR). D'autres récepteurs comme le TNFR1 et les récepteurs TRAILR1 et TRAILR2 appartenant également à cette famille ont été identifiés par la suite [139, 149]. Plusieurs travaux ont rapporté que les récepteurs de mort TRAIL-R et TNF-R sont capables eux aussi d'induire la mort des lignées cellulaires T Jurkat E6.1 que nous avons utilisé dans cette étude [240]. De plus, il a été démontré que suite à la liaison de ces derniers à leur ligands respectifs TNF- α et TRAIL, ils sont capables comme Fas, d'induire la mort cellulaire suite à l'activation de la caspase 8 [153, 154]. Ces données sont en accord avec nos résultats qui ont montrés que suite à son interaction avec l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$, le sCD154 est capable d'inhiber la réponse de mort cellulaire induite par Fas et cela par la suppression du clivage de la caspase-8 et nous laisse supposer que le même mécanisme est utilisé ici par le sCD154 afin d'inhiber la réponse de mort induite par TRAIL-R et TNF-R. Par ailleurs, nos résultats confirment davantage le rôle de l'interaction CD154/ $\alpha 5 \beta 1$ dans la persistance des cellules T.

Jusqu'à maintenant, nos résultats ainsi que les travaux effectués sur l'interaction du CD154 avec ses récepteurs les intégrines ont tous porté sur la forme soluble du CD154 ou des intégrines. Le CD154 existe sous deux formes, une forme membranaire et une forme soluble [8, 9, 242], qui résulte du clivage enzymatique de la forme membranaire par les métalloprotéinases ADAM-10 et ADAM-17 [8]. Les deux formes membranaire et soluble du CD154 forment un homotrimer qui est biologiquement actif [8, 9]. Il est bien documenté que les deux formes du CD154 membranaire et soluble (sous leur forme trimérique) peuvent interagir avec le CD40 [242] et induire différentes réponses biologiques dans les nombreuses cellules immunitaires qui les expriment. La découverte des nouveaux récepteurs du CD154, les intégrines $\alpha 5 \beta 1$, $\alpha M \beta 2$, $\alpha v \beta 3$ et $\alpha IIb \beta 3$ [60, 61, 62, 63], ouvre le champ des questions quant à la nature de l'interaction et le rôle de cette dernière dans les différentes réponses biologiques. Dans une autre partie de cette étude, nous avons voulu déterminer si la forme membranaire du CD154 est, comme la forme soluble, capable d'interagir avec les intégrines pour induire différentes réponses biologiques, notamment comme dans le cas de l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$, pour activer les voies de signalisation p38 et Erk et inhiber l'apoptose induite par les récepteurs de mort, ce

qui permettrait d'accentuer davantage la persistance des cellules T aux cours des réponses inflammatoires.

Nous avons démontré dans cette étude que le mCD154 peut lier l'intégrine $\alpha 5\beta 1$, mais seulement par une interaction cis, quand ces dernières sont exprimées à la surface d'une même cellule. Cette interaction est capable d'inhiber la mort induite via FAS, TRAIL et TNF dans les lignées T Jurkat E6.1-hCD154.

La forme membranaire est comme on a vu, très importante, non seulement du fait qu'elle soit exprimée par plusieurs types cellulaires, mais également par ce qu'elle est surexprimée par plusieurs cellules immunitaires lors des maladies inflammatoire et autoimmunes et que suite à son clivage par les métalloprotéines, la forme soluble est libérée dans les liquides biologiques. En effet, le CD154 est exprimé par toutes les cellules impliquées dans la pathogenèse de l'athérosclérose: cellules endothéliales, lymphocytes T, monocytes/macrophages et cellules musculaires lisses [13, 25, 242]. Chez les patients souffrants de SLE, le mCD154 est surexprimé sur les cellules T $CD4^+$ et $CD8^+$, mais également par les lymphocytes B et les monocytes des patients [215, 283, 290, 291]. Dans l'arthrite rhumatoïde, le CD154 est surexprimé à la surface des lymphocytes T synoviaux des patients en comparaison avec les contrôles [215, 283, 290, 291].

Les intégrines sont également exprimées par plusieurs types cellulaires. L'intégrine $\alpha IIb\beta 3$ est exprimée sur les plaquettes et les mégacaryocytes [60, 195, 177], l'intégrine $\alpha M\beta 2$ est principalement sur les monocytes, les macrophages et les neutrophiles [62] et l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ est exprimée à la surface des cellules immunitaires comme les lymphocytes T et B, les monocytes, les macrophages, les plaquettes, et les cellules dendritiques [61, 202, 207, 208]. Les intégrines sont également surexprimées lors de nombreuses maladies auto-immunes, ou elles favorisent la survie et le maintien des cellules immunitaires [321, 322]. Elles favorisent également la croissance tumorale dans différents cancers comme le cancer du poumon et le cancer du sein [318, 319, 320].

Dans cette étude, nous avons utilisé un modèle de cellules Jurkat T transfectées avec le gène du hCD154. Ces cellules expriment exclusivement l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et sont négatifs pour les autres récepteurs. Les cellules T Jurkat E6.1-hCD154 expriment également les différents récepteurs de mort FAS, TRAIL-R1, TRAIL-R2 et TNF-R1 et sont donc sensibles à la mort par apoptose. Nous avons montré que contrairement aux cellules Jurkat T Jurkat E6.1-NT n'exprimant pas le CD154, les cellules Jurkat E6.1-hCD154, étaient capable d'inhiber la mort induite par les différents récepteurs de mort FAS, TRAIL et TNF. Ces résultats vont donc le sens de nos précédentes observations, où l'interaction du sCD154 avec $\alpha 5\beta 1$ inhibe la mort induite via les différents récepteurs de la famille des TNF et souligne davantage l'importance et l'implication de l'axe CD154/ $\alpha 5\beta 1$ dans la résistance des cellules T à la mort par apoptose notamment dans les maladies auto-immunes.

Nous avons également montré que l'interaction du mCD154 avec l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ est due seulement par un mécanisme cis quand les deux molécules sont exprimées à la surface d'une même cellule. En effet, on a montré que lorsque le CD154 ou l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ étaient exprimées à la surface de deux cellules différentes en utilisant un système de co-culture, aucune inhibition de mort était observée au niveau des cellules T Jurkat E6.1 suite à leur traitement avec les récepteurs de mort FAS ou TRAIL et cela dans n'importe quel ratio utilisé. Les mêmes résultats ont été obtenus lorsqu'on a utilisé le même système de co-culture avec des cellules T CD3⁺.

Les interactions de type cis et trans sur les membranes cellulaires ont été décrites pour de nombreuses molécules de surface cellulaire [325]. Différentes réponses biologiques pourraient être obtenues suite à une interaction cis ou trans, permettant ainsi de réguler les réponses biologiques [327]. En effet, dans les cellules NK, il a été démontré une interaction cis entre un récepteur inhibiteur du CMH de classe I et le CMH de classe I [328]. En effet, le récepteur inhibiteur Ly49 sur les cellules NK qui contiennent des ITIM dans sa partie cytoplasmique, se lie non seulement au ligand H-2Dd exprimé sur les cellules cibles (interaction trans) mais interagit également avec H-2Dd sur la même surface cellulaire (interaction cis). L'interaction cis empêche la capacité de liaison de Ly49A à H-2Dd sur les cellules cibles, induisant ainsi une réduction de la signalisation négative induite par Ly49A. Bien

que la manière dont l'interaction cis ou trans affecte la signalisation inhibitrice par Ly49A reste mal comprise, il a été rapporté que cette interaction cis peut atténuer le seuil d'activation des cellules NK [328].

D'autres études ont rapporté que lors de l'allergie, la signalisation cellulaire qui active les cellules effectrices, les mastocytes et les basophiles, est régulée par différents récepteurs inhibiteurs situés à leur surface. Le récepteur LILRB2 (leukocyte immunoglobulin-*like* receptor B2) et son orthologue chez le souris, le récepteur PIR-B (paired immunoglobulin (Ig)-likereceptors), s'associent de manière constitutive au CMH de classe I sur la même cellule par une interaction cis, et contrôle la production des IgE dans les mastocytes. Cette interaction cis est également capable de réguler la libération de cytokines [329]. Ainsi, la liaison constitutive en cis entre LILRB2 ou PIR-B et le CMH de classe I joue un rôle essentiel dans la régulation des réponses allergiques [329].

Une interaction cis entre Sema6A et son récepteurs Plexin-A4 a également été décrite par Liat Haklai-Topper et ses collaborateurs. Sema6A est une sémaphorine transmembranaire qui régule la formation de projections d'axones dans l'hippocampe, ainsi que la formation du tractus rachidien cortical et la migration des cellules granulaires mais favorise également la croissance dendritique des neurones. Il a été démontré que l'interaction cis de Sema6A avec Plexin-A4 empêche la liaison de Sema6A avec ses autres récepteurs en trans [330].

Des études plus récentes ont montré que dans les neutrophiles, l'intégrine de Mac-1, sous sa forme inactive, était capable d'interagir en cis avec le récepteur FcγRIIA, suite à la liaison des glycanes sialylés de FcγRIIA avec le domaine αI de Mac-1 via des cations divalents. Cette interaction induit la diminution de l'affinité du récepteur pour les IgG et réduit le recrutement de neutrophiles au site immunitaire [331]. Il a été montré qu'une déficience dans le Mac-1 dans de neutrophiles humains entraîne une accumulation accrue des neutrophiles dans l'endothélium [331]. Ainsi, l'interaction en cis entre Mac-1 et FcγRIIA est un moyen de réguler l'accumulation des neutrophiles au site inflammatoire lors d'une réponse immunitaire, et une

perturbation de ce processus pourrait avoir des implications importantes dans les maladies inflammatoires et auto-immunes.

L'ensemble de ses travaux vont dans le sens de nos résultats qui ont montré que le mCD154 peut interagir avec l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ en cis, et peut inhiber la mort induite via les différents récepteurs de morts. Etant donné qu'aucun effet de cette interaction n'a été observé en trans, on peut penser que le mCD154 interagit avec $\alpha 5\beta 1$ en cis et que cette interaction inhibe l'interaction du CD154 en trans, comme ce qui a été rapporté plus haut avec les autres molécules.

Nos résultats sont très intéressants, car ils démontrent pour la première fois l'existence d'une interaction cis du CD154 avec $\alpha 5\beta 1$. Plusieurs cellules immunitaires peuvent exprimer les deux molécules au même temps, comme les cellules T activées, les cellules dendritiques, les monocytes/macrophages, les plaquettes activées et même les cellules B lors d'un état pathologique. On pourrait penser que dans ces cellules le CD154 peut interagir avec $\alpha 5\beta 1$ en cis afin de maintenir un homéostasie immunitaire et de ce fait, le CD40 serait le seul récepteur du CD154 à pouvoir interagir avec ce dernier sous sa forme membranaire (en cis ou en trans) ou soluble pour induire une panoplie de réponses biologiques dans les divers cellules immunitaires et que les intégrines interagissent avec la forme soluble ou membranaire mais en cis du CD154 afin d'induire des réponses bien définies et maintenir un certain équilibre immunologique. Ce-ci rajoute davantage de complexité compte aux interactions du CD154 avec ses récepteurs. Par ailleurs, lors des réponses inflammatoires et auto-immunes, ou les cellules T jouent un rôle crucial notamment dans la PR, la sclérose en plaques et le SLE, le niveau de soluble ainsi que le membranaire CD154 sont augmentés [25, 215, 241]. On observe également dans les maladies auto-immunes des quantités aberrantes d'intégrines $\beta 1$ [232]. De ce fait, l'interaction CD154 / $\alpha 5\beta 1$ est augmentée lors de ces pathologies augmentant ainsi la survie et la persistance des cellules T et le maintien d'un environnement inflammatoire.

En conclusion, cette étude ajoute des informations importantes sur la nature de l'interaction CD154 / $\alpha 5\beta 1$ dans les cellules T. Cette nouvelle observation inculpe davantage le CD154 et ses récepteurs les intégrines plus particulièrement l'intégrine

$\alpha 5\beta 1$ dans l'initiation, mais également dans la progression et la persistance des pathologies inflammatoires et auto-immunes en particulier. L'inhibition spécifique de cet axe peut représenter une cible thérapeutique potentielle dans le traitement des pathologies. Cependant des études in vivo plus approfondies seront nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

6. Perspectives

Dans cette étude, nous avons montré que le sCD154 se lie spécifiquement à l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ sur les cellules T, et que cette interaction inhibe l'apoptose cellulaire induite par Fas mais également par les autres récepteurs de mort TRAIL et TNF dans les lignées cellulaires Jurkat E6.1. Cet effet a également été observé pour les cellules T humaines TCD3⁺ activées et de façon plus importante dans les cellules TCD4⁺. Enfin, nous avons montré que le mCD154 était capable d'inhiber la mort induite via les différents récepteurs de mort Fas, TRAIL et TNF, lorsqu'il interagit avec l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ en cis.

Cependant, plusieurs questions méritent d'être explorées. Par exemple, nous avons montré que l'interaction CD154/ $\alpha 5\beta 1$ protège davantage les cellules TCD4⁺ de la mort induite par Fas que les cellules TCD8⁺. On sait que les cellules TCD4⁺ constituent une population de cellules très hétérogènes et différentes sous-populations ont été identifiées dont les Th1, Th2, Treg et Th17 qui ont chacune un rôle bien déterminé dans lors de la réponse immunitaire. De ce fait, il serait très intéressant d'évaluer la contribution du couple CD154/ $\alpha 5\beta 1$ dans la réponse spécifique de chacune de ces sous populations lymphocytaires.

Nous avons démontré que le mCD154 est capable d'interagir avec l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ par une liaison cis dépendante. Il est important ici d'investiguer si ce mode d'interaction est généralisé pour les autres intégrines $\alpha v\beta 3$, $\alpha IIb\beta 3$ et Mac-1 et de comparer les réponses biologiques induites par le membranaire et soluble CD154.

Il est maintenant bien connu que des taux élevés du sCD154 sont retrouvés dans le liquide biologique lors de plusieurs maladies auto-immunes comme le lupus et que les cellules T de ces patients expriment des niveaux élevés de CD154 [241, 215]. D'autre part, l'intégrine $\beta 1$ est surexprimée dans les cellules T des patients atteints du lupus [321]. Il serait intéressant d'évaluer l'expression de la sous unité $\alpha 5$ sur ses cellules, afin de voir si l'interaction CD154/ $\alpha 5\beta 1$ en cis est capable de protéger les cellules T de la mort induite via les différents récepteurs de mort. Le sCD154 retrouvé dans le sérum des patients peut lui aussi contribuer à la survie des cellules T exprimant l'intégrine $\alpha 5\beta 1$. Ceci permettrait de valider nos résultats et de mettre

un lien direct de l'implication du couple CD154/ $\alpha 5\beta 1$ dans les maladies auto-immunes et le lupus en particulier.

De nombreuses études confirment l'implication de l'axe CD154 / CD40 dans diverses affections immunitaires et inflammatoires telles que la polyarthrite rhumatoïde. Le CD154 active de nombreuses cellules d'importance critique dans la pathogenèse de la PR, induisant des réponses telles que la libération de cytokines, la dégradation de la matrice et la production d'autoanticorps, et favorise ainsi le développement de la maladie. Bien que l'étiologie de ces maladies reste non résolue, plusieurs preuves confirment le rôle clé des interactions CD154 / CD40 dans l'initiation de ces maladies [278, 279, 280, 283, 284]. La découverte de nouveaux récepteurs pour le CD154 : $\alpha \text{IIb}\beta 3$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha \nu\beta 3$ et $\alpha \text{M}\beta 2$ a élargi notre compréhension de l'implication du CD154 dans la physiopathologie de la réponse inflammatoire chronique dans la polyarthrite rhumatoïde. Il serait ici intéressant d'étudier le rôle de l'interaction du CD154 avec ses récepteurs dans un modèle in vivo d'arthrite chez la souris (CIA) et identifier la contribution de chacun des récepteurs.

Étant donné la forme trimérique du CD154, que différents résidus sont impliqués dans sa liaison avec ses récepteurs, que le CD154 se lie à chacune des intégrines d'une manière spécifique et que divers cellules peuvent exprimer différents récepteurs du CD154, nous pensons que le CD154 peut interagir simultanément avec plusieurs récepteurs. Pour cela on peut utiliser la technique de Bret (Bioluminescence Resonance Energy Transfer) pour identifier ses interactions.

7. Bibliographie

1. Lederman, S., Yellin, M. J., Krichevsky, A., Belko, J., Lee, J. J., & Chess, L. (1992) Identification of a novel surface protein on activated CD4⁺ T cells that induces contact-dependent B cell differentiation (help). *J Exp Med*, 175(4), 1091-1101.
2. Locksley, R. M., Killeen, N., & Lenardo, M. J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*, 104(4), 487-501.
3. Noelle, R. J., Roy, M., Shepherd, D. M., Stamenkovic, I., Ledbetter, J. A., & Aruffo, A. (1992). A 39-kDa protein on activated helper T cells binds CD40 and transduces the signal for cognate activation of B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(14), 6550-6554.
4. Armitage, R. J., Fanslow, W. C., Strockbine, L., Sato, T. A., Clifford, K. N., Macduff, B. M. (1992). Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40. *Nature*, 357(6373), 80-82.
5. van Kooten, C., & Banchereau, J. (2000). CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol*, 67(1), 2-17.
6. Schonbeck, U., Mach, F., & Libby, P. (2000). CD154 (CD40 ligand). *Int J Biochem Cell Biol*, 32(7), 687-693.
7. Lafage-Pochitaloff, M., Herman, P., Birg, F., Galizzi, J. P., Simonetti, J., Mannoni, P., & Banchereau, J. (1994). Localization of the human CD40 gene to chromosome 20, bands q12-q13.2. *Leukemia*, 8(7), 1172-1175.
8. Yacoub, D., Benslimane, N., Al-Zoobi, L., Hassan, G., Nadiri, A., & Mourad, W. (2013). CD154 is released from T-cells by a disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10 (ADAM10) and ADAM17 in a CD40 protein-dependent manner. *J Biol Chem*, 288(50), 36083-36093.

9. Pietravalle, F., Lecoanet-Henchoz, S., Blasey, H., Aubry, J. P., Elson, G., Edgerton, M. D., Gauchat, J. F. (1996). Human native soluble CD40L is a biologically active trimer, processed inside microsomes. *J Biol Chem*, 271(11), 5965-5967.
10. Karpusas, M., Hsu, Y. M., Wang, J. H., Thompson, J., Lederman, S., Chess, L., & Thomas, D. (1995). 2 A crystal structure of an extracellular fragment of human CD40 ligand. *Structure*, 3(10), 1031-1039.
11. Graf, D., Muller, S., Korthauer, U., van Kooten, C., Weise, C., & Kroczeck, R. A. (1995). A soluble form of TRAP (CD40 ligand) is rapidly released after T cell activation. *Eur J Immunol*, 25(6), 1749-1754.
12. Schonbeck, U., & Libby, P. (2001). The CD40/CD154 receptor/ligand dyad. *Cell Mol Life Sci*, 58(1), 4-43.
13. Hassan, G. S., Merhi, Y., & Mourad, W. M. (2009). CD154 and its receptors in inflammatory vascular pathologies. *Trends Immunol*, 30(4), 165-172.
14. Reyes-Moreno, C., Girouard, J., Lapointe, R., Darveau, A., & Mourad, W. (2004). CD40/CD40 homodimers are required for CD40-induced phosphatidylinositol 3-kinase-dependent expression of B7.2 by human B lymphocytes. *J Biol Chem*, 279(9), 7799-7806.
15. Grandien, A., Bras, A., & Martinez, C. (1996). Acquisition of CD40 expression during murine B-cell differentiation. *Scand J Immunol*, 43(1), 47-55.
16. Banchereau, J., Bazan, F., Blanchard, D., Briere, F., Galizzi, J. P., van Kooten, C., . . . Saeland, S. (1994). The CD40 antigen and its ligand. *Annu Rev Immunol*, 12, 881-922.

17. Hollenbaugh, D., Ochs, H. D., Noelle, R. J., Ledbetter, J. A., & Aruffo, A. (1994). The role of CD40 and its ligand in the regulation of the immune response. *Immunol Rev*, 138, 23-37.
18. Fanslow, W. C., Srinivasan, S., Paxton, R., Gibson, M. G., Spriggs, M. K., & Armitage, R. J. (1994). Structural characteristics of CD40 ligand that determine biological function. *Semin Immunol*, 6(5), 267-278. doi:10.1006/smim.1994.1035
19. Peters, A. L., Stunz, L. L., & Bishop, G. A. (2009). CD40 and autoimmunity: the dark side of a great activator. *Semin Immunol*, 21(5), 293-300. doi:10.1016/j.smim.2009.05.012
20. Tone, M., Tone, Y., Fairchild, P. J., Wykes, M., & Waldmann, H. (2001). Regulation of CD40 function by its isoforms generated through alternative splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(4), 1751-1756.
21. Elgueta, R., Benson, M. J., de Vries, V. C., Wasiuk, A., Guo, Y., & Noelle, R. J. (2009). Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunol Rev*, 229(1), 152-172.
22. Georgopoulos, N. T., Steele, L. P., Thomson, M. J., Selby, P. J., Southgate, J., & Trejdosiewicz, L. K. (2006). A novel mechanism of CD40-induced apoptosis of carcinoma cells involving TRAF3 and JNK/AP-1 activation. *Cell Death Differ*, 13(10), 1789-1801.
23. Chan, F. K., Chun, H. J., Zheng, L., Siegel, R. M., Bui, K. L., & Lenardo, M. J. (2000). A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science*, 288(5475), 2351-2354.
24. Schaller, M. D., & Parsons, J. T. (1994). Focal adhesion kinase and associated proteins. *Curr Opin Cell Biol*, 6(5), 705-710.

25. Hassan, G.S., et al., Implication of CD154/CD40 Interaction in Healthy and Autoimmune Responses. (2009). *Curr Immunol Rev*, 285-299.
26. Bajorath, J., Chalupny, N. J., Marken, J. S., Siadak, A. W., Skonier, J., Gordon, Aruffo, A. (1995). Identification of residues on CD40 and its ligand which are critical for the receptor-ligand interaction. *Biochemistry*, 34(6), 1833-1844
27. Bajorath, J., Marken, J. S., Chalupny, N. J., Spoon, T. L., Siadak, A. W., Gordon, Aruffo, A. (1995). Analysis of gp39/CD40 interactions using molecular models and site-directed mutagenesis. *Biochemistry*, 34(31), 9884-9892.
28. Foy, T. M., Aruffo, A., Bajorath, J., Buhlmann, J. E., & Noelle, R. J. (1996). Immune regulation by CD40 and its ligand GP39. *Annu Rev Immunol*, 14, 591-617.
29. Hill, A., & Chapel, H. (1993). X-linked immunodeficiency. The fruits of cooperation. *Nature*, 361(6412), 494.
30. Lougaris, V., Badolato, R., Ferrari, S., & Plebani, A. (2005). Hyperimmunoglobulin M syndrome due to CD40 deficiency: clinical, molecular, and immunological features. *Immunol Rev*, 203, 48-66.
31. Hsu, Y. M., Lucci, J., Su, L., Ehrenfels, B., Garber, E., & Thomas, D. (1997). Heteromultimeric complexes of CD40 ligand are present on the cell surface of human T lymphocytes. *J Biol Chem*, 272(2), 911-915.
32. Clodi, K., Asgary, Z., Zhao, S., Kliche, K. O., Cabanillas, F., Andreeff, M., & Younes, A. (1998). Coexpression of CD40 and CD40 ligand in B-cell lymphoma cells. *Br J Haematol*, 103(1), 270-275.
33. Grammer, A. C., Bergman, M. C., Miura, Y., Fujita, K., Davis, L. S., & Lipsky, P. E. (1995). The CD40 ligand expressed by human B cells costimulates B cell responses. *J Immunol*, 154(10), 4996-5010.

34. Gray, D., Bergthorsdottir, S., van Essen, D., Wykes, M., Poudrier, J., & Siepmann, K. (1997). Observations on memory B-cell development. *Semin Immunol*, 9(4), 249-254.
35. Pound, J. D., & Gordon, J. (1997). Maintenance of human germinal center B cells in vitro. *Blood*, 89(3), 919-928.
36. Grewal, I. S., Xu, J., & Flavell, R. A. (1995). Impairment of antigen-specific T-cell priming in mice lacking CD40 ligand. *Nature*, 378(6557), 617-620.
37. van Essen, D., Kikutani, H., & Gray, D. (1995). CD40 ligand-transduced co-stimulation of T cells in the development of helper function. *Nature*, 378(6557), 620-623.
38. Ahmed, K. A., Wang, L., Munegowda, M. A., Mulligan, S. J., Gordon, J. R., Griebel, P., & Xiang, J. (2012). Direct in vivo evidence of CD4⁺ T cell requirement for CTL response and memory via pMHC-I targeting and CD40L signaling. *J Leukoc Biol*, 92(2), 289-300.
39. Higham, E. M., Wittrup, K. D., & Chen, J. (2010). Activation of tolerogenic dendritic cells in the tumor draining lymph nodes by CD8⁺ T cells engineered to express CD40 ligand. *J Immunol*, 184(7), 3394-3400. doi:10.4049/jimmunol.0903111
40. Umeshappa, C. S., Xie, Y., Xu, S., Nanjundappa, R. H., Freywald, A., Deng, Y., . . . Xiang, J. (2013). Th cells promote CTL survival and memory via acquired pMHC-I and endogenous IL-2 and CD40L signaling and by modulating apoptosis-controlling pathways. *PLoS One*, 8(6), e64787.
41. Zhang, X., Huang, H., Yuan, J., Sun, D., Hou, W. S., Gordon, J., & Xiang, J. (2005). CD4-8- dendritic cells prime CD4⁺ T regulatory 1 cells to suppress antitumor immunity. *J Immunol*, 175(5), 2931-2937.

42. Litinskiy, M. B., Nardelli, B., Hilbert, D. M., He, B., Schaffer, A., Casali, P., & Cerutti, A. (2002). DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BLyS and APRIL. *Nat Immunol*, 3(9), 822-829.
43. Shepherd, D. M., & Kerkvliet, N. I. (1999). Disruption of CD154:CD40 blocks generation of allograft immunity without affecting APC activation. *J Immunol*, 163(5), 2470-2477.
44. Iezzi, G., Sonderegger, I., Ampenberger, F., Schmitz, N., Marsland, B. J., & Kopf, M. (2009). CD40-CD40L cross-talk integrates strong antigenic signals and microbial stimuli to induce development of IL-17-producing CD4⁺ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(3), 876-881.
45. Cella, M., Scheidegger, D., Palmer-Lehmann, K., Lane, P., Lanzavecchia, A., & Alber, G. (1996). Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J Exp Med*, 184(2), 747-752.
46. Caux, C., Massacrier, C., Vanbervliet, B., Dubois, B., Van Kooten, C., Durand, I., & Banchereau, J. (1994). Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J Exp Med*, 180(4), 1263-1272.
47. Ma, D. Y., & Clark, E. A. (2009). The role of CD40 and CD154/CD40L in dendritic cells. *Semin Immunol*, 21(5), 265-272.
48. Duffau P, Seneschal J, Nicco C, Richez C, Lazaro E, Douchet I, Bordes C, Viallard JF, Goulvestre C, Pellegrin JL, Weil B, Moreau JF, Batteux F, Blanco P. (2010). Platelet CD154 potentiates interferon-alpha secretion by plasmacytoid dendritic cells in systemic lupus erythematosus. *Science Translational Medicine*, Vol. 2, Issue 47, pp. 47ra63.

49. Alderson, M. R., Armitage, R. J., Tough, T. W., Strockbine, L., Fanslow, W. C., & Spriggs, M. K. (1993). CD40 expression by human monocytes: regulation by cytokines and activation of monocytes by the ligand for CD40. *J Exp Med*, 178(2), 669-674.
50. Stout, R. D., Suttles, J., Xu, J., Grewal, I. S., & Flavell, R. A. (1996). Impaired T cell-mediated macrophage activation in CD40 ligand-deficient mice. *J Immunol*, 156(1), 8-11.
51. Mach, F., Schonbeck, U., Bonnefoy, J. Y., Pober, J. S., & Libby, P. (1997). Activation of monocyte/macrophage functions related to acute atheroma complication by ligation of CD40: induction of collagenase, stromelysin, and tissue factor. *Circulation*, 96(2), 396-399
52. Malik N, Greenfield BW, Wahl AF, Kiener PA. (1996). Activation of human monocytes through CD40 induces matrix metalloproteinases. *J Immunol*, 156(10):3952-3960.
53. Hakkinen, T., Karkola, K., Yla-Herttuala, S. (2000). Macrophages, smooth muscle cells, endothelial cells, and T-cells express CD40 and CD40L in fatty streaks and more advanced human atherosclerotic lesions. Colocalization with epitopes of oxidized low-density lipoprotein, scavenger receptor, and CD16 (Fc gammaRIII). *Virchows Arch*. 437, 396–405.
54. Cella M, Scheidegger D, Palmer-Lehmann K, Lane P, Lanzavecchia A, Alber G. (1996). Ligation of cd40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances t cell stimulatory capacity: T-t help via apc activation. *J Exp Med*. 184:747-752
55. Henn V, Slupsky JR, Grafe M, Anagnostopoulos I, Forster R, Muller-Berghaus G, Kroczeck RA. (1998). Cd40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* ;391:591-594

56. Horton DB, Libby P, Schonbeck U: Ligation of CD40 on vascular smooth muscle cells mediates loss of interstitial collagen via matrix metalloproteinase activity. (2001). *Ann N Y Acad Sci*, 947:329-336.

57. Newby AC. (2007) Metalloproteinases and vulnerable atherosclerotic plaques. *Trends Cardiovasc Med*, 17(8):253-258.

58. Rizvi M, Pathak D, Freedman JE, Chakrabarti S. (2008). CD40-CD40 ligand interactions in oxidative stress, inflammation and vascular disease. *Trends Mol Med*, 14(12):530-538.

59. Bavendiek U, Libby P, Kilbride M, Reynolds R, Mackman N, Schonbeck U. (2002). : Induction of tissue factor expression in human endothelial cells by CD40 ligand is mediated via activator protein 1, nuclear factor kappa B, and Egr-1. *J Biol Chem*, 277(28):25032-25039.

60. Andre, P., Nannizzi-Alaimo, L., Prasad, S.K., Phillips, D.R. (2002a). Platelet-derived CD40L: the switch-hitting player of cardiovascular disease. *Circulation* 106, 896–899.

61. Leveille, C., Bouillon, M., Guo, W., Bolduc, J., Sharif-Askari, E., El-Fakhry, Y., Reyes-Moreno, C., Lapointe, R., Merhi, Y., Wilkins, J.A., Mourad, W., 2007. CD40 ligand binds to $\alpha 5\beta 1$ integrin and triggers cell signaling. *J. Biol. Chem.* 282, 5143–5151

62. Zirlik, A., Maier, C., Gerdes, N., MacFarlane, L., Soosairajah, J., Bavendiek, U., Ahrens, I., Ernst, S., Bassler, N., Missiou, A., Patko, Z., Aikawa, M., Schonbeck, U., Bode, C., Libby, P., Peter, K., 2007. CD40 ligand mediates inflammation independently of CD40 by interaction with Mac-1. *Circulation* 115, 1571–1580.

63. Yoko K. Takada, Jessica Yu, Michiko Shimoda and Yoshikazu Takada. (2019). Integrin Binding to the Trimeric Interface of CD40L Plays a Critical Role in CD40/CD40L Signaling. *The Journal of Immunology* 203:1383-1391.

64. Hynes, R. O. (2004). The emergence of integrins: a personal and historical perspective. *Matrix Biol*, 23(6), 333-340. doi:10.1016/j.matbio.2004.08.001
65. Hynes, R.O. (2002). Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines. *Cell* 110, 673-687.
66. Guo, W., and Giancotti, F.G. (2004). Integrin signalling during tumour progression. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 816-826.
67. Shattil S. J., Kim C. and Ginsberg M. H. (2010). The final steps of integrin activation: the end game. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 288-300.
68. Desgrosellier J. S. and Cheresch D. A. (2010). Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* 10, 9-22.
69. van der Flier A. and Sonnenberg A. (2001). Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res* 305, 285-298.
70. Streuli C. H. and Akhtar N. (2009). Signal co-operation between integrins and other receptor systems. *Biochem J* 418, 491-506.
71. Harburger D. S. and Calderwood D. A. (2009). Integrin signalling at a glance. *J Cell Sci* 122, 159-163.
72. Pozzi A. and Zent R. (2011). Extracellular matrix receptors in branched organs. *Curr Opin Cell Biol* 23, 547-553.
73. Margadant C, Raymond K, Kreft M, Sachs N, Janssen H, Sonnenberg A (2009) Integrin $\alpha 3 \beta 1$ inhibits directional migration and wound re-epithelialization in the skin. *J Cell Sci* 122: 278–288.

74. Watt F. M. (2002). The stem cell compartment in human interfollicular epidermis. *J Dermatol Sci* 28, 173-180.
75. Takada Y., Ye X. and Simon S. (2007). The integrins. *Genome Biol* 8, 215.
76. Bouvard D., Pouwels J., De Franceschi N. and Ivaska J. (2013). Integrin inactivators: balancing cellular functions in vitro and in vivo. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14, 430-442.
77. Claus Oxvig and Timothy A. Experimental support for a β -propeller domain in integrin α -subunits and a calcium binding site on its lower surface. *Springer PNAS* April 28, 1998 95 (9) 4870-4875;
78. Takamatsu Y., Simmons P. J. and Levesque J. P. (1998). Dual control by divalent cations and mitogenic cytokines of alpha 4 beta 1 and alpha 5 beta 1 integrin avidity expressed by human hemopoietic cells. *Cell Adhes Commun* 5, 349-366.
79. Xiong, J. P., T. Stehle, et al. (2001). "Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3." *Science* 294(5541): 339-45.
80. Hynes, R. O. (1987). "Integrins: a family of cell surface receptors." *Cell* 48(4): 549-54.
81. Ylanne, J., J. Huuskonen, et al. (1995). "Mutation of the cytoplasmic domain of the integrin beta 3 subunit. Differential effects on cell spreading, recruitment to adhesion plaques, endocytosis, and phagocytosis." *J Biol Chem* 270(16): 9550-7.
82. Askari J. A., Buckley P. A., Mould A. P. and Humphries M. J. (2009). Linking integrin conformation to function. *J Cell Sci* 122, 165-170.
83. Humphries, J. D., A. Byron, et al. (2006). "Integrin ligands at a glance." *J Cell Sci* 119(Pt 19): 3901-3.

84. Brizzi M. F., Tarone G. and Defilippi P. (2012). Extracellular matrix, integrins, and growth factors as tailors of the stem cell niche. *Curr Opin Cell Biol* 24, 645-651.
85. Calderwood D. A., Fujioka Y., de Pereda J. M., Garcia-Alvarez B., Nakamoto T., Margolis B., McGlade C. J., Liddington R. C. and Ginsberg M. H. (2003). Integrin betacytoplasmic domain interactions with phosphotyrosine-binding domains: a structural prototype for diversity in integrin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 2272-2277.
86. Montanez E., Ussar S., Schifferer M., Bosl M., Zent R., Moser M. and Fassler R. (2008). Kindlin-2 controls bidirectional signaling of integrins. *Genes Dev* 22, 1325-1330.
87. Moser M., Nieswandt B., Ussar S., Pozgajova M. and Fassler R. (2008). Kindlin-3 is essential for integrin activation and platelet aggregation. *Nat Med* 14, 325-330.
88. Wehrle-Haller B. (2012). Assembly and disassembly of cell matrix adhesions. *Curr Opin Cell Biol* 24, 569-581.
89. Mould AP, Akiyama SK, Humphries MJ. (1995). Regulation of integrin alpha 5 beta 1-fibronectin interactions by divalent cations. Evidence for distinct classes of binding sites for Mn^{2+} , Mg^{2+} , and Ca^{2+} . *J Biol Chem*. Nov 3;270(44):26270-7.
90. Du, X. P., Plow, E. F., Frelinger, A. L., 3rd, O'Toole, T. E., Loftus, J. C., & Ginsberg, M. H. (1991). Ligands "activate" integrin alpha IIb beta 3 (platelet GPIIb-IIIa). *Cell*, 65(3), 409-416.
91. Frelinger, A. L., 3rd, Du, X. P., Plow, E. F., & Ginsberg, M. H. (1991). Monoclonal antibodies to ligand-occupied conformers of integrin alpha IIb beta 3 (glycoprotein IIb-IIIa) alter receptor affinity, specificity, and function. *J Biol Chem*, 266(26), 17106-17111.

92. Kim, M., Carman, C. V., & Springer, T. A. (2003). Bidirectional transmembrane signaling by cytoplasmic domain separation in integrins. *Science*, 301(5640), 1720-1725.
93. Yan, B., Calderwood, D. A., Yaspan, B., & Ginsberg, M. H. (2001). Calpain cleavage promotes talin binding to the beta 3 integrin cytoplasmic domain. *J Biol Chem*, 276(30), 28164-28170.
94. Martel, V., Racaud-Sultan, C., Dupe, S., Marie, C., Paulhe, F., Galmiche, A., . . . Albiges-Rizo, C. (2001). Conformation, localization, and integrin binding of talin depend on its interaction with phosphoinositides. *J Biol Chem*, 276(24), 21217-21227.
95. Calderwood, D. A., Yan, B., de Pereda, J. M., Alvarez, B. G., Fujioka, Y., Liddington, R. C., & Ginsberg, M. H. (2002). The phosphotyrosine binding-like domain of talin activates integrins. *J Biol Chem*, 277(24), 21749-21758.
96. Tu, Y., Wu, S., Shi, X., Chen, K., & Wu, C. (2003). Migfilin and Mig-2 link focal adhesions to filamin and the actin cytoskeleton and function in cell shape modulation. *Cell*, 113(1), 37-47.
97. Oxley, C. L., Anthis, N. J., Lowe, E. D., Vakonakis, I., Campbell, I. D., & Wegener, K. L. (2008). An integrin phosphorylation switch: the effect of beta3 integrin tail phosphorylation on Dok1 and talin binding. *J Biol Chem*, 283(9), 5420-5426. doi:10.1074/jbc.M709435200
98. Bouvard, D., Aszodi, A., Kostka, G., Block, M. R., Albiges-Rizo, C., & Fassler, R. (2007). Defective osteoblast function in ICAP-1-deficient mice. *Development*, 134(14), 2615-2625.
99. Bouvard, D., Vignoud, L., Dupe-Manet, S., Abed, N., Fournier, H. N., Vincent-Monegat, C., . . . Block, M. R. (2003). Disruption of focal adhesions by integrin cytoplasmic domain-associated protein-1 alpha. *J Biol Chem*, 278(8), 6567-6574.

100. Rantala, J. K., Pouwels, J., Pellinen, T., Veltel, S., Laasola, P., Mattila, E., . . . Ivaska, J. (2011). SHARPIN is an endogenous inhibitor of beta1-integrin activation. *Nat Cell Biol*, 13(11), 1315-1324.
101. Cornillon J., Campos L. and et Guyotat D. (2003). Focal adhesion kinase (FAK), une protéine aux fonctions multiples. *médecine sciences*, 643-762
102. Berrier A. L. and Yamada K. M. (2007). Cell-matrix adhesion. *J Cell Physiol* 213, 565-573
103. Choma D. P., Milano V., Pumiglia K. M. and DiPersio C. M. (2007). Integrin alpha3beta1-dependent activation of FAK/Src regulates Rac1-mediated keratinocyte polarization on laminin-5. *J Invest Dermatol* 127, 31-40.
104. Petit V. and Thiery J. P. (2000). Focal adhesions: structure and dynamics. *Biol Cell* 92,477-494.
105. Harburger D. S. and Calderwood D. A. (2009). Integrin signalling at a glance. *J Cell Sci* 122, 159-163.
106. Calderwood D. A., Fujioka Y., de Pereda J. M., Garcia-Alvarez B., Nakamoto T., Margolis B., McGlade C. J., Liddington R. C. and Ginsberg M. H. (2003). Integrin beta cytoplasmic domain interactions with phosphotyrosine-binding domains: a structural prototype for diversity in integrin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 2272-2277.
107. Brizzi M. F., Tarone G. and Defilippi P. (2012). Extracellular matrix, integrins, and growth factors as tailors of the stem cell niche. *Curr Opin Cell Biol* 24, 645-651.

108. Korkaya H., Paulson A., Charafe-Jauffret E., Ginestier C., Brown M., Dutcher J., Clouthier S. G. and Wicha M. S. (2009). Regulation of mammary stem/progenitor cells by PTEN/Akt/beta-catenin signaling. *PLoS Biol* 7, e1000121.
109. Srichai MB, Zent R. Integrin structure and function. In: Zent R, Pozzi A, editors. (2010). *Cell-extracellular matrix interactions in cancer*. New York: Springer; 19-41.
110. Burridge K. and Chrzanowska-Wodnicka M. (1996). Focal adhesions, contractility, and signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12, 463-518.
111. Wozniak M. A., Desai R., Solski P. A., Der C. J. and Keely P. J. (2003). ROCK-generated contractility regulates breast epithelial cell differentiation in response to the physical properties of a three-dimensional collagen matrix. *J Cell Biol* 163, 583-595.
112. Schober M., Raghavan S., Nikolova M., Polak L., Pasolli H. A., Beggs H. E., Reichardt L. F. and Fuchs E. (2007). Focal adhesion kinase modulates tension signaling to control actin and focal adhesion dynamics. *J Cell Biol* 176, 667-680.
113. Geiger B, Spatz JP, Bershadsky AD (2009) Environmental sensing through focal adhesions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 21–33
114. Vicente-Manzanares M., Choi C. K. and Horwitz A. R. (2009). Integrins in cell migration--the actin connection. *J Cell Sci* 122, 199-206.
115. Shen B., Delaney M. K. and Du X. (2012). Inside-out, outside-in, and inside-outside-in: G protein signaling in integrin-mediated cell adhesion, spreading, and retraction. *Curr Opin Cell Biol* 24, 600-606.
116. Rottner K. and Stradal T. E. (2011). Actin dynamics and turnover in cell motility. *Curr Opin Cell Biol* 23, 569-578.

117. Yu X, Miyamoto S, Mekada E. (2000). Integrin alpha 2 beta 1-dependent EGF receptor activation at cell-cell contact sites. *J Cell Sci*, 113:2139-2147.
118. Goel HL, Breen M, Zhang J, Das I, Aznavoorian-Cheshire S, Greenberg NM, Elgavish A, Languino LR. (2005). beta1A integrin expression is required for type 1 insulin-like growth factor receptor mitogenic and transforming activities and localization to focal contacts. *Cancer Res*, 65(15):6692-6700.
119. Cabodi S, del Pilar Camacho-Leal M, Di Stefano P, Defilippi P (2010). Integrin signalling adaptors: not only figurants in the cancer story. *Nat Rev Cancer*, 10: 858–870.
120. Brizzi M. F., Tarone G. and Defilippi P. (2012). Extracellular matrix, integrins, and growth factors as tailors of the stem cell niche. *Curr Opin Cell Biol* 24, 645-651.
121. Guadamillas M. C., Cerezo A. and Del Pozo M. A. (2011). Overcoming anoikis--pathways to anchorage-independent growth in cancer. *J Cell Sci* 124, 3189-3197.
122. Long, W., Yi, P., Amazit, L., LaMarca, H. L., Ashcroft, F., Kumar, R., . . . O'Malley, B. W. (2010). SRC-3Delta4 mediates the interaction of EGFR with FAK to promote cell migration. *Mol Cell*, 37(3), 321-332. doi:10.1016/j.molcel.2010.01.004
123. Schlaepfer, D. D., Hunter, T. (1998). Integrin signalling and tyrosine phosphorylation: just the FAKs? *Trends Cell Biol.* 8, 151-7.
124. James, M. F., et al. (2004). A NHERF binding site links the betaPDGFR to the cytoskeleton and regulates cell spreading and migration. *J Cell Sci.* 117, 2951-61.
125. Sieg, D. J., et al. (2000). FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration. *Nat Cell Biol.* 2, 249-56.

126. Engler, A.J., S. Sen, H.L. Sweeney, and D.E. Discher. (2006). Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*. 126:677–689. doi:10.1016/j.cell.2006.06.044
127. Damsky, C. H., (1999). Extracellular matrix-integrin interactions in osteoblast function and tissue remodeling. *Bone*. 25, 95-6.
128. Taddei I., Deugnier M. A., Faraldo M. M., Petit V., Bouvard D., Medina D., Fassler R., Thiery J. P. and Glukhova M. A. (2008). Beta1 integrin deletion from the basal compartment of the mammary epithelium affects stem cells. *Nat Cell Biol* 10, 716-722.
129. Raymond K, Kreft M, Jassen H, Calafat J, Sonnenberg A. (2005) Keratinocytes display normal proliferation, survival and differentiation in conditional b4 integrin knockout mice. *J Cell Sci* 118: 1045–1060
130. Jikko, A., et al. (1999). Collagen integrin receptors regulate early osteoblast differentiation induced by BMP-2. *J Bone Miner Res*. 14, 1075-83.
131. Webb, S. J., Harrison, D. J., & Wyllie, A. H. (1997). Apoptosis: an overview of the process and its relevance in disease. *Adv Pharmacol*, 41, 1-34.
132. Alnemri, D.J. Livingstone, D.W. Nicholson, G. Salvesen, N.A. Thornberry, W.W. Wong, J. Yuan Human. (1996). ICE/CED-3 protease nomenclature *Cell*, 87, 171
133. Lavrik, I. N., Mock, T., Golks, A., Hoffmann, J. C., Baumann, S., & Krammer, P. H. (2008). CD95 stimulation results in the formation of a novel death effector domain protein-containing complex. *J Biol Chem*, 283(39), 26401-26408.

134. Zou, H., Henzel, W. J., Liu, X., Lutschg, A. & Wang, X. (1997). Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 90, 405–413.
135. Kischkel, F. C. et al. (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.* 14, 5579–5588.
136. Li, H., Wang, X., Li, N., Qiu, J., Zhang, Y., & Cao, X. (2007). hPEBP4 resists TRAIL-induced apoptosis of human prostate cancer cells by activating Akt and deactivating ERK1/2 pathways. *J Biol Chem*, 282(7), 4943-4950.
137. Muzio M, Ni J, Feng P, Dixit VM. (1997). IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. *Science*. 28;278(5343):1612-5.
138. Stennicke, H. R., Jurgensmeier, J. M., Shin, H., Deveraux, Q., Wolf, B. B., Yang, Salvesen, G. S. (1998). Pro-caspase-3 is a major physiologic target of caspase-8. *J Biol Chem*, 273(42), 27084-27090.
139. Amarante-Mendes GP, Green DR. (1999). The regulation of apoptotic cell death. 1053-61.
140. Trauth BC, Klas C, Peters AM, Matzku S, Möller P, Falk W, Debatin KM, Krammer PH. (1989). Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science*. 245(4915):301-5.
141. Pitti RM, Marsters SA, Ruppert S, Donahue CJ, Moore A, Ashkenazi A (1996). Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family, 271(22):12687-90.

142. Locksley, R. M., Killeen, N. & Lenardo, M. J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104, 487–501.
143. Smith CA, Farrah T, Goodwin RG. (1994). The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell*. 76(6):959-62.
144. Itoh N, Nagata S. (1993). A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *J Biol Chem*. 268(15):10932-7.
145. Tartaglia LA, Goeddel DV, Reynolds C, Figari IS, Weber RF, Fendly BM, Palladino MA Jr. (1993). Stimulation of human T-cell proliferation by specific activation of the 75-kDa tumor necrosis factor receptor. *J Immunol*, 151(9):4637-41.
146. Algeciras-Schimmich, A., Shen, L., Barnhart, B. C., Murmann, A. E., Burkhardt, J. K., & Peter, M. E. (2002). Molecular ordering of the initial signaling events of CD95. *Mol Cell Biol*, 22(1), 207-220.
147. Aggarwal, B. B. (2003). Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 745–756.
148. Martinez-Caballero, S., Dejean, L. M., Kinnally, M. S., Oh, K. J., Mannella, C. A., & Kinnally, K. W. (2009). Assembly of the mitochondrial apoptosis-induced channel, MAC. *J Biol Chem*, 284(18), 12235-12245.
149. Zou, H., Henzel, W. J., Liu, X., Lutschg, A. & Wang, X. (1997). Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 90, 405–413
150. Ichim G, Tait SW. (2016). A fate worse than death: apoptosis as an oncogenic process. *Nat Rev Cancer*.(8):539-48.
151. Taddei ML, Giannoni E, Fiaschi T, Chiarugi P. (2012). Anoikis : an emerging hallmark in health and diseases. *J Pathol*; 226 : 380–393.

152. Green DR, Oberst A, Dillon CP. (2011). RIPK-dependent necrosis and its regulation by caspases : a mystery in five acts. *Mol Cell* ; 44 : 9–16.
153. Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y. (2011). The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu Rev Cell Dev Biol*; 27 : 107-32.
154. Remijsen Q, Kuijpers TW, Wirawan E. (2011). Dying for a cause : NETosis, mechanisms behind an antimicrobial cell death modality. *Cell Death Differ*; 18 : 581–588.
155. Lippens S, Denecker G, Ovaere P. (2005). Death penalty for keratinocytes : apoptosis versus cornification. *Cell Death Differ*; 12 : 1497–1508.
156. Si Ming Man, Rajendra Karki, and Thirumala-Devi Kanneganti. (2017). Molecular mechanisms and functions of pyroptosis, inflammatory caspases and inflammasomes in infectious diseases. *Immunol Rev*; 277(1): 61–75.
157. Martin SS, Vuori K. (2004). Regulation of Bcl-2 proteins during anoikis and amorphosis. *Biochim Biophys Acta*, 1692 : 145-7.
158. Beaulieu, J. F. (1999). Integrins and human intestinal cell functions. *Front Biosci*, 4, D310-321.
159. Ameisen JC. Anoikis. (2005). *Med Sci*, 21 : 117.
160. Chiarugi P, Giannoni E. (2008). Anoikis: a necessary death program for anchoredependent cells. *Biochem Pharmacol*, 76(11):1352-1364.
161. Simpson CD, Anyiwe K. (2008). Schimmer AD: Anoikis resistance and tumor metastasis. *Cancer Lett*, 272(2):177-185.

162. Reddig PJ, Juliano RL. (2005). Clinging to life: cell to matrix adhesion and cell survival. *Cancer Metastasis Rev*, 24(3):425-439.
163. Boudreau NJ, Jones PL. (1999). Extracellular matrix and integrin signaling the shape of things to come. *Biochem J*, 339 : 481-8.
164. Grossmann J. (2002). Molecular mechanisms of « detachment-induced apoptosis-anoikis ». *Apoptosis*, 7 : 247-260.
165. Giancotti FG. (1999). Complexity and specificity of integrin signaling. *Nat Cell Biol*, 2 : E13-4.
166. Cornillion J, Campos L, Guyotat D. (2003). Focal adhesion kinase (FAK), une protéine aux fonctions multiples. *Med Sci* 19 : 743-52.
167. Frisch SM, Screaton RA. (2001). Anoikis mechanisms. *Curr Opin Cell Biol*, 13: 555-62.
168. Stupack DG, Cheresch DA. (2002). Get a ligand, get a life : integrins, signaling and cell survival. *J Cell Sci*, 115 : 3729-38.
169. Song G, Ouyang G, Bao S. (2005). The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol*, 9 : 59-71.
170. Pierre H. Vachon .M/S : médecine sciences *Survie cellulaire : différences et différenciation.*
171. Kyriakis JM, Avruch J. (2001). Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev*, 81 : 807-69.
172. Harnois C, Demers M-J, Bouchard V, et al. (2004). Human intestinal epithelial crypt cell survival and death : complex modulations of Bcl-2 homologs by Fak, PI3-K/Akt-1, MEK/Erk, and p38 signaling pathways. *J Cell Physiol*; 198 : 209-22.

173. Vachon PH, Harnois C, Grenier A, et al. (2002). Differentiation state-selective roles of p38 isoforms in human intestinal epithelial cell anoikis. *Gastroenterology*, 123 : 1980-91.
174. Nurden. A.T. (1995). Polymorphisms of human platelet membrane glycoproteins: structure and clinical significance. *Thromb Haemost*, 74: 345-351.
175. Von dem. Borne A.E., Decary F. (1990). ISCH/ISBT Working Party on platelet serology. Nomenclature of platelet-specific antigens. *Vox sang*, 58(2):176.
176. Gidwitz S, Temple Brenda and White Gilbert C, II. (2004). Mutations in and near the second calcium-binding domain of integrin α IIb affect the structure and function of integrin α IIb β 3. *Biochem. J.* 379: 449-459.
177. Aiken Martha L., Mark H. Ginsberg, and Edward F. Plow. (1986). Identification of a New Class of Inducible Receptors on Platelets Thrombospondin Interacts with Platelets via a GPIIb-IIIa-independent Mechanism. *J. Clin. Invest*, 78: 1713-1716.
178. Calvete J. (1994). Clues for understanding the structure and function of a prototypic human integrin: The platelet glycoprotein IIb-IIIa complex. *Thromb Haemost*, 72: 1-15.
179. Bray P.F, Rosa Jean-Philippe, Johnston Geoffrey I., Shiu Donny T., Cook Richard G, Lau Chris, Yuet Wai Kan, McEvert Rodger P. et Shuman Marc A. (1987). Platelet Glycoprotein IIb Chromosomal Localization and Tissue Expression. *J. Clin. Invest*, 80: 1812-1817.
180. Wagner CL, Mascelli MA, Neblock DS, Weisman HF, Collier BS, Jordan RE. (1996). Analysis of gpiib/iiia receptor number by quantification of 7e3 binding to human platelets. *Blood*, 88:907-914.

181. Smyth SS, Joneckis CC, Parise LV. (1993). Regulation of vascular integrins. *Blood*, 81:2827-2843.
182. Fitzgerald, L. A., Steiner, B., Rall, S. C., Jr., Lo, S. S. and Phillips, D. R.(1987). Protein sequence of endothelial glycoprotein IIIa derived from a cDNA clone. Identity with platelet glycoprotein IIIa and similarity to integrin. *J. Biol Chem*, 262: 3936-3939.
183. Zimrin A. B., Eisman R., Vilaire G., Schwartz E., Bennett J. S., and Poncez M. (1988). Structure of platelet glycoprotein IIIa. A common subunit for two different membrane receptors. *J. Clin. Invest*, 81: 1470-1475.
184. Humphries MJ. (2000). Integrin structure. *Biochem Soc Trans*, 28:311-339.
185. Du X, Gu M, Weisel JW, Nagaswami C, Bennett JS, Bowditch R, Ginsberg MH. (1993). Long range propagation of conformational changes in integrin alpha iib beta 3. *J Biol Che*, 268:23087-23092.
186. Wippler J, Kouns WC, Schlaeger EJ, Kuhn H, Hadvary P, Steiner B. (1994). The integrin alpha iib-beta 3, platelet glycoprotein iib-iiia, can form a functionally active heterodimer complex without the cysteine-rich repeats of the beta 3 subunit. *J Biol Chem*, 269:8754-8761.
187. Hassan, G. S., Merhi, Y., & Mourad, W. (2012). CD40 ligand: a neo-inflammatory molecule in vascular diseases. *Immunobiology*, 217(5), 521-532. doi:10.1016/j.imbio.2011.03.010
188. Yacoub, D., Hachem, A., Theoret, J.F., Gillis, M.A., Mourad, W., Merhi, Y. (2010). Enhanced levels of soluble CD40 ligand exacerbate platelet aggregation and thrombus formation through a CD40-dependent tumor necrosis factor receptor-associated factor-2/Rac1/p38 mitogen-activated protein kinase signalling pathway. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30, 2424–2433.

189. Lefkovits J, Plow EF, Topol EJ. (1995). Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptors in cardiovascular medicine. *N Engl J Med* 332(23):1553–9.
190. Andre, P., Prasad, K.S., Denis, C.V., He, M., Papalia, J.M., Hynes, R.O., Phillips, D.R., Wagner, D.D. (2002). CD40L stabilizes arterial thrombi by a beta3 integrin-dependent mechanism. *Nat. Med.* 8, 247–252.
191. Prasad, K.S., Andre, P., He, M., Bao, M., Manganello, J., Phillips, D.R., (2003). Soluble CD40 ligand induces beta3 integrin tyrosine phosphorylation and triggers.
192. Kato, A. (1997). The biologic and clinical spectrum of Glanzmann's thrombasthenia: implications of integrin alpha IIb beta 3 for its pathogenesis. *Crit Rev Oncol Hematol*, 26(1) 1-23.
193. Alturaihi H, Hassan GS, Al-Zoobi L, Salti S, Darif Y, Yacoub D, et al. (2015). Interaction of CD154 with different receptors and its role in bidirectional signals. *Eur J Immunol*, 45(2):592–602.
194. El Fakhry Y, Alturaihi H, Yacoub D, Liu L, Guo W, Leveille C, et al. (2012). Functional interaction of CD154 protein with alpha5beta1 integrin is totally independent from its binding to alphaIIb beta3 integrin and CD40 molecules. *J Biol Chem*, 287(22):18055–66.
195. May, A.E., Kalsch, T., Massberg, S., Herouy, Y., Schmidt, R., Gawaz, M., (2002). Engagement of glycoprotein IIb/IIIa (alpha (IIb)beta3) on platelets upregulates CD40L and triggers CD40L-dependent matrix degradation by endothelial cells. *Circulation* 106, 2111–2117.
196. Nathaly Anto Michel, Andreas Zirlik and Dennis Wolf. CD40L and its Receptors in Atherothrombosis.

197. Elner SG, Elner VM (1996). The integrin superfamily and the eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 37(5):696-701.
198. Argraves WS, Pytela R, Suzuki S, Millan JL, Pierschbacher MD, Ruoslahti E. (1986). cDNA sequences from the alpha subunit of the fibronectin receptor predict a transmembrane domain and a short cytoplasmic peptide. *J Biol Chem*, 261(28):12922-12924.
199. Argraves WS, Suzuki S, Arai H, Thompson K, Pierschbacher MD, Ruoslahti E. (1987). Amino acid sequence of the human fibronectin receptor. *J Cell Biol*, 105(3):1183-1190.
200. Pierschbacher MD, Ruoslahti E. (1984). Variants of the cell recognition site of fibronectin that retain attachment-promoting activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81(19):5985-5988.
201. Akiyama SK, Yamada KM. (1985). Synthetic peptides competitively inhibit both direct binding to fibroblasts and functional biological assays for the purified cellbinding domain of fibronectin. *J Biol Chem*, 260(19):10402-10405.
202. Suehiro K, Gailit J, Plow EF. (1997). Fibrinogen is a ligand for integrin alpha5beta1 on endothelial cells. *J Biol Chem*, 272(8):5360-5366.
203. Suehiro K, Mizuguchi J, Nishiyama K, Iwanaga S, Farrell DH, Ohtaki S. (2000). Fibrinogen binds to integrin alpha(5)beta(1) via the carboxyl-terminal RGD site of the Aalpha-chain. *J Biochem*, 128(4):705-710.
204. Sincock PM, Mayrhofer G, Ashman LK. (1997). Localization of the transmembrane 4 superfamily (TM4SF) member PETA-3 (CD151) in normal human tissues: comparison with CD9, CD63, and alpha5beta1 integrin. *J Histochem Cytochem*, 45(4):515-525.

205. Shimizu Y, Van Seventer GA, Horgan KJ, Shaw S. (1990). Regulated expression and binding of three VLA (beta 1) integrin receptors on T cells. *Nature*, 345(6272):250-253.
206. Shimizu Y, van Seventer GA, Horgan KJ, Shaw S. (1990). Costimulation of proliferative responses of resting CD4⁺ T cells by the interaction of VLA-4 and VLA-5 with fibronectin or VLA-6 with laminin. *J Immunol*, 145(1):59-67.
207. Nesti LJ, Caterson EJ, Wang M, Chang R, Chapovsky F, Hoek JB, Tuan RS. (2002). TGFbeta1 calcium signaling increases alpha5 integrin expression in osteoblasts. *J Orthop Res*, 20(5):1042-1049.
208. Collo G, Pepper MS. (1999). Endothelial cell integrin alpha5beta1 expression is modulated by cytokines and during migration in vitro. *J Cell Sci*, 112 (Pt4):569-578.
209. Lowin T, Straub RH, Neumann E, Bosserhoff A, Vogel C, Moissl C, Anders S, Muller-Ladner U, Schedel J. (2009). Glucocorticoids increase alpha5 integrin expression and adhesion of synovial fibroblasts but inhibit ERK signaling, migration, and cartilage invasion. *Arthritis Rheum*, 60(12):3623-3632.
210. Boles BK, Ritzenthaler J, Birkenmeier T, Roman J. (2000). Phorbol ester-induced U-937 differentiation: effects on integrin alpha(5) gene transcription. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 278(4):L703-712.
211. Lefcort F, Venstrom K, McDonald JA, Reichardt LF. (1992). Regulation of expression of fibronectin and its receptor, alpha 5 beta 1, during development and regeneration of peripheral nerve. *Development*, 116(3):767-782.
212. Barry S, Collier1 and Sanford J. Shattil. The GPIIb/IIIa (integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$) odyssey: a technology-driven saga of a receptor with twists, turns, and even a bend.

213. Obara M, Kang MS, Yamada KM. (1988). Site-directed mutagenesis of the cell-binding domain of human fibronectin: separable, synergistic sites mediate adhesive function. *Cell* 53(4):649–57.
214. Mould AP, Askari JA, Humphries MJ. (2000). Molecular basis of ligand recognition by integrin $\alpha 5\beta 1$. I. Specificity of ligand binding is determined by amino acid sequences in the second and third NH₂-terminal repeats of the α subunit. *J Biol Chem*, 275(27):20324–36.
215. Alaaeddine, N., Hassan, G. S., Yacoub, D., & Mourad, W. (2012). CD154: an immunoinflammatory mediator in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Clin Dev Immunol*, 2012, 490148.
216. Breithaupt-Faloppa, A.C., Kleinheinz, J., Crivello Jr, O. (2006). Endothelial cell reaction on a biological material. *J. Biomed. Mater. Res. B: Appl. Biomater.* 76, 49–55.
217. Orecchia, A., Lacal, P.M., Schietroma, C., Morea, V., Zambruno, G., Failla, C.M. (2003). Vascular endothelial growth factor receptor-1 is deposited in the extracellular matrix by endothelial cells and is a ligand for the $\alpha 5\beta 1$ integrin. *J. Cell Sci.* 116, 3479–3489.
218. Wang, J., Milner, R., (2006). Fibronectin promotes brain capillary endothelial cell survival and proliferation through $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha v\beta 3$ integrins via MAP kinase signalling. *J. Neurochem.* 96, 148–159.
219. Blystone, S.D., Graham, I.L., Lindberg, F.P., Brown, E.J. (1994). Integrin $\alpha v\beta 3$ differentially regulates adhesive and phagocytic functions of the fibronectin receptor $\alpha 5\beta 1$. *J. Cell Biol*, 127, 1129–1137.
220. Seales, E.C., Shaikh, F.M., Woodard-Grice, A.V., Aggarwal, P., McBrayer, A.C., Hennessy, K.M., Bellis, S.L. (2005). A protein kinase C/Ras/ERK signaling

pathway activates myeloid fibronectin receptors by altering beta1 integrin sialylation. *J. Biol. Chem.*, 280, 37610–37615.

221. Rahman, S., Aitken, A., Flynn, G., Formstone, C., Savidge, G.F. (1998). Modulation of RGD sequence motifs regulates disintegrin recognition of alphaIIb beta3 and alpha5 beta1 integrin complexes. Replacement of elegantin alanine-50 with proline, N-terminal to the RGD sequence, diminishes recognition of the alpha5 beta1 complex with restoration induced by Mn²⁺ cation. *Biochem. J.* 335 (Pt 2), 247–257.

222. Barillari, G., Albonici, L., Incerpi, S., Bogetto, L., Pistrutto, G., Volpi, A., Ensoli, B., Manzari, V. (2001). Inflammatory cytokines stimulate vascular smooth muscle cells locomotion and growth by enhancing alpha5beta1 integrin expression and uncton. *Atherosclerosis* 154, 377–385.

223. Gui, P., Wu, X., Ling, S., Stotz, S.C., Winkfein, R.J., Wilson, E., Davis, G.E., Braun, A.P., Zamponi, G.W., Davis, M.J. (2006). Integrin receptor activation triggers converging regulation of Cav1.2 calcium channels by c-Src and protein kinase A pathways. *J. Biol. Chem.* 281, 14015–14025.

224. Hauzenberger D, Klominek J, Holgersson J, Bergstrom SE, Sundqvist KG. (1997). Triggering of motile behavior in T lymphocytes via cross-linking of alpha 4 beta 1 and alpha L beta 2. *J Immunol*, 158(1):76-84.

225. Woods ML, Cabanas C, Shimizu Y. (2000). Activation-dependent changes in soluble fibronectin binding and expression of beta1 integrin activation epitopes in T cells: relationship to T cell adhesion and migration. *Eur J Immunol*, 30(1):38-49.

226. Seminario MC, Sterbinsky SA, Bochner BS. (1998). Beta 1 integrin-dependent binding of Jurkat cells to fibronectin is regulated by a serine-threonine phosphatase. *J Leukoc Biol*, 64(6):753-758.

227. Stoolman LM, Wang TL, Situ R, Varani J. (1993). Regulation of fibronectin and laminin binding activity in cultured human lymphoblastic cell lines. *J Cell Physiol*, 154(3):593-600.
228. Shimizu Y, van Seventer GA, Horgan KJ, Shaw S. (1990). Costimulation of proliferative responses of resting CD4⁺ T cells by the interaction of VLA-4 and VLA-5 with fibronectin or VLA-6 with laminin. *J Immunol*, 145(1):59-67.
229. Davis LS, Oppenheimer-Marks N, Bednarczyk JL, McIntyre BW, Lipsky PE. (1990). Fibronectin promotes proliferation of naive and memory T cells by signalling through both the VLA-4 and VLA-5 integrin molecules. *J Immunol*, 145(3):785-793.
230. Maguire JE, Danahey KM, Burkly LC, van Seventer GA. (1995). T cell receptor- and beta1 integrin-mediated signals synergize to induce tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase (pp125FAK) in human T cells. *J Exp Med*, 182(6):2079-2090.
231. Udagawa T, McIntyre BW. (1992). A VLA-4 alpha-chain specific monoclonal antibody enhances CD3-induced IL-2/IL-2 receptor-dependent T-cell proliferation. *Lymphokine Cytokine Res*, 11(5):193-199.
232. Stallmach A, Giese T, Pfister K, Wittig BM, Kunne S, Humphries M, Zeitz M, Meuer SC. (2001). Activation of beta(1) integrins mediates proliferation and inhibits apoptosis of intestinal CD4-positive lymphocytes. *Eur J Immunol*, 31(4):1228-1238.
233. Holmstrom TH, Schmitz I, Soderstrom TS, Poukkula M, Johnson VL, Chow SC, Krammer PH, Eriksson JE. (2000). MAPK/ERK signaling in activated T cells inhibits CD95/Fas-mediated apoptosis downstream of DISC assembly. *EMBO J*, 19(20):5418-5428.

234. Su CC, Lin YP, Cheng YJ, Huang JY, Chuang WJ, Shan YS, Yang BC. (2007). Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt activation by integrin-tumor matrix interaction suppresses Fas-mediated apoptosis in T cells. *J Immunol*, 174(1):4589-4597.
235. Xia H, Nho RS, Kahm J, Kleidon J, Henke CA. (2004). Focal adhesion kinase is upstream of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt in regulating fibroblast survival in response to contraction of type I collagen matrices via a beta 1 integrin viability signaling pathway. *J Biol Chem*, 279(31):33024-33034.
236. Allan LA, Morrice N, Brady S, Magee G, Pathak S, Clarke PR. (2003). Inhibition of caspase-9 through phosphorylation at Thr 125 by ERK MAPK. *Nat Cell Biol*, 5(7):647-654.
237. Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME. (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*, 91(2):231-241.
238. Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S, Reed JC. (1998). Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science*, 282(5392):1318-1321.
239. Wu LX, La Rose J, Chen L, Neale C, Mak T, Okkenhaug K, Wange R, Rottapel R. (2005). CD28 regulates the translation of Bcl-xL via the phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin pathway. *J Immunol*, 174(1):180-194.
240. Lin YP, Su CC, Huang JY, Lin HC, Cheng YJ, Liu MF, Yang BC. (2009). Aberrant integrin activation induces p38 MAPK phosphorylation resulting in suppressed Fas-mediated apoptosis in T cells: implications for rheumatoid arthritis. *Mol Immunol*, 46(16):3328-3335.
241. Hassan, G. S., Yacoub, D., Alaaeddine, N., Nadiri, A., Merhi, Y., & Mourad, W. (2013). CD154: the atherosclerotic risk factor in rheumatoid arthritis? *Arthritis Res Ther*, 15(1), 206

242. Alturaihi, H., Hassan, G. S., Al-Zoobi, L., Salti, S., Darif, Y., Yacoub, D., . . . Mourad, W. (2015). Interaction of CD154 with different receptors and its role in bidirectional signals. *Eur J Immunol*, 45(2), 592-602.
243. Loubaki, L., Semlali, A., Boisvert, M., Jacques, E., Plante, S., Aoudjit, F., . . . Chakir, J. (2010). Crosstalk between T cells and bronchial fibroblasts obtained from asthmatic subjects involves CD40L/ α 5 β 1 interaction. *Mol Immunol*, 47(11-12), 2112-211
244. Simic D, Bogdan N, Teng F, Otieno M. (2015). Blocking α 5 β 1 integrin attenuates sCD40L-mediated platelet activation. *Clin Appl Thromb Hemost* 1–8.
245. Elena Y. Senchenkova, Janice Russell, Shantel A. Vital, Alper Yildirim, A. Wayne Orr, D. Neil Granger, and Felicity N. E. Gavins. (2018). A critical role for both CD40 and VLA5 in angiotensin II-mediated thrombosis and inflammation. *FASEB J.*, 32(6):3448-3456.
246. Dunne JL, Ballantyne CM, Beaudet AL, Ley K. (2002). Control of leukocyte rolling velocity in TNF- α -induced inflammation by LFA-1 and Mac-1. *Blood*, 99(1):336–41.
247. Altieri DC, Agbanyo FR, Plescia J, Ginsberg MH, Edgington TS, Plow EF. (1990). A unique recognition site mediates the interaction of fibrinogen with the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *J Biol Chem* , 265(21):12119–22.
248. Kanse SM, Matz RL, Preissner KT, Peter K. (2004). Promotion of leukocyte adhesion by a novel interaction between vitronectin and the β 2 integrin Mac-1 (α 5 β 1, CD11b/CD18). *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24(12):2251–6.

249. Peter K, Schwarz M, Conradt C, Nordt T, Moser M, Kubler W, et al. (1999). Heparin inhibits ligand binding to the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *Circulation*, 100(14):1533–9.
250. Ehlers R, Ustinov V, Chen Z, Zhang X, Rao R, Luscinskas FW, et al. (2003). Targeting platelet-leukocyte interactions: identification of the integrin Mac-1 binding site for the platelet counter receptor glycoprotein Ib α . *J Exp Med* 198(7):1077–88.
251. Chavakis T, Bierhaus A, Al-Fakhri N, Schneider D, Witte S, Linn T, et al. (2003). The pattern recognition receptor (RAGE) is a counterreceptor for leukocyte integrins: a novel pathway for inflammatory cell recruitment. *J Exp Med* 198(10):1507–15.
252. Fink K, Busch HJ, Bourgeois N, Schwarz M, Wolf D, Zirlik A, et al. (2013). Muhlen: Mac-1 directly binds to the endothelial protein C-receptor: a link between the protein C anticoagulant pathway and inflammation? *PLoS One* 8(2):e53103.
253. Simon DI. (2011). Opening the field of integrin biology to “biased agonism”. *Circ Res*, 109(11):1199–201.
254. Lee JO, Rieu P, Arnaout MA, Liddington R. (1995). Crystal structure of the A domain from the α subunit of integrin CR3 (CD11b/CD18). *Cell*, 80:631–638.
255. Jawhara, S., Pluskota, E., Cao, W., Plow, E. F., & Soloviev, D. A. (2017). Distinct Effects of Integrins α X β 2 and α M β 2 on Leukocyte Subpopulations during Inflammation and Antimicrobial Responses. *Infect Immun*, 85(1).
256. Dunne JL, Ballantyne CM, Beaudet AL, Ley K. (2002). Control of leukocyte rolling velocity in TNF- α -induced inflammation by LFA-1 and Mac-1. *Blood*, 99(1):336–41.

257. Dunne JL, Collins RG, Beaudet AL, Ballantyne CM, Ley K. (2003). Mac-1, but not LFA-1, uses intercellular adhesion molecule-1 to mediate slow leukocyte roll-ing in TNF-alpha-induced inflammation. *J Immunol*, 6105–11.
258. Wolf D, Hohmann JD, Wiedemann A, Bledzka K, Blankenbach H, Marchini T, et al. (2011). Binding of CD40L to Mac-1's I-domain involves the EQLKKSKTL motif and mediates leukocyte recruitment and atherosclerosis – but does not affect immunity and thrombosis in mice. *Circ Res*, 109(11):1269–79.
259. Okwor I, Jia P, Uzonna JE.(2015). Interaction of Macrophage Antigen 1 and CD40 Ligand Leads to IL-12 Production and Resistance in CD40-Deficient Mice Infected with *Leishmaniamajor*.*J Immunol*.
260. Kerstin Amann, Christian S. Haas, Julian Schu"ssler, Christoph Daniel, Andrea Hartner and Harald O. Scho"cklmann (2012). Beneficial effects of integrin avb3-blocking RGD peptides in early but not late phase of experimental glomerulonephritis. 27: 1755–1768.
261. Tucker GC. Alpha v integrin inhibitors and cancer therapy (2003). *Curr Opin Investig Drugs*, 4: 722–731.
262. Omari, K.M., Chui, R., Dorovini-Zis, K.. (2004). Induction of beta-chemokine secretion by human brain microvessel endothelial cells via CD40/CD40L interactions. *J. Neuroimmunol.* 146, 203–208.
263. Pluvinet, R., Olivar, R., Krupinski, J., Herrero-Fresneda, I., Luque, A., Torras, J., Cruzado, J.M., Grinyo, J.M., Sumoy, L., Aran, J.M. (2008). CD40: an upstream master switch for endothelial cell activation uncovered by RNAi-coupled transcriptional profiling. *Blood* 112, 3624–3637.
264. Lievens, D., Zerneck, A., Seijkens, T., Soehnlein, O., Beckers, L., Munnix, I.C., Wijnands, E., Goossens, P., van Kruchten, R., Thevissen, L., Boon, L., Flavell, R.A., Noelle, R.J., Gerdes, N., Biessen, E.A., Daemen, M.J., Heemskerk, J.W.,

Weber, C., Lutgens, E. (2010). Platelet CD40L mediates thrombotic and inflammatory processes in atherosclerosis. *Blood* 116, 4317–4327.

265. Thienel, U., Loike, J., Yellin, M.J. (1999). CD154 (CD40L) induces human endothelial cell chemokine production and migration of leukocyte subsets. *Cell. Immunol.* 198, 87–95.

266. Chen, C., Chai, H., Wang, X., Jiang, J., Jamaluddin, M.S., Liao, D., Zhang, Y., Wang, H., Bharadwaj, U., Zhang, S., Li, M., Lin, P., Yao, Q. (2008). Soluble CD40 ligand induces endothelial dysfunction in human and porcine coronary artery endothelial cells. *Blood* 112, 3205–3216.

267. Lutgens, E., Daemen, M.J. (2002). CD40–CD40L interactions in atherosclerosis. *Trends Cardiovasc. Med.* 12, 27–32.

268. Chai, H., Aghaie, K., Zhou, W. (2009). Soluble CD40 ligand induces human coronary artery smooth muscle cells proliferation and migration. *Surgery* 146, 5–11.

269. Mukundan L, Milhorn DM, Matta B, Suttles. (2004). J. Cd40-mediated activation of vascular smooth muscle cell chemokine production through a src-initiated, mapk-dependent pathway. *Cell Signal.*;16:375-384

270. Matthies KM, Newman JL, Hodzic A, Wingett DG. (2006). Differential regulation of soluble and membrane cd40l proteins in t cells. *Cell Immunol.* ;241:47-58

271. Rothe M, Sarma V, Dixit VM, Goeddel DV. (1995). Traf2-mediated activation of nf-kappa b by tnf receptor 2 and cd40. *Science.*;269:1424-1427

272. Schonbeck U, Mach F, Sukhova GK, Murphy C, Bonnefoy JY, Fabunmi RP, Libby P.M. (1997). Regulation of matrix metalloproteinase expression in human

vascular smooth muscle cells by t lymphocytes: A role for cd40 signaling in plaque rupture? *Circ Res.*;81:448-454

273. Miller DL, Yaron R, Yellin MJ. (1998). Cd40l-cd40 interactions regulate endothelial cell surface tissue factor and thrombomodulin expression. *J Leukoc Biol*;63:373-379

274. Zhou L, Stordeur P, de Lavarelle A, Thielemans K, Capel P, Goldman M, Pradier O. (1998). Cd40 engagement on endothelial cells promotes tissue factor-dependent procoagulant activity. *Thromb Haemost.*;79:1025-1028

275. Akiyama T, Shimo Y, Yanai H, Qin J, Ohshima D, Maruyama Y, Asaumi Y, Kitazawa J, Takayanagi H, Penninger JM, Matsumoto M, Nitta T, Takahama Y, Inoue J. (2008). The tumor necrosis factor family receptors rank and cd40 cooperatively establish the thymic medullary microenvironment and self-tolerance. *Immunity* ;29:423-437

276. Barbe-Tuana FM, Klein D, Ichii H, Berman DM, Coffey L, Kenyon NS, Ricordi C, Pastori RL. (2006). Cd40-cd40 ligand interaction activates proinflammatory pathways in pancreatic islets. *Diabetes*;55:2437-2445

277. Noss EH, Brenner MB. (2008). The role and therapeutic implications of fibroblast-like synoviocytes in inflammation and cartilage erosion in rheumatoid arthritis. *Immunol Rev.*;223:252-270

278. Harigai, M. Hara, S. Nakazawa. (1999). "Ligation of CD40 induced tumor necrosis factor- α in rheumatoid arthritis: a novel mechanism of activation of synoviocytes," *Journal of Rheumatology*, 5, 1035–1043,

267. Lutgens, E., Daemen, M.J. (2002). CD40–CD40L interactions in atherosclerosis. *Trends Cardiovasc. Med.* 12, 27–32.

268. Chai, H., Aghaie, K., Zhou, W. (2009). Soluble CD40 ligand induces human coronary artery smooth muscle cells proliferation and migration. *Surgery* 146, 5–11.
269. Mukundan L, Milhorn DM, Matta B, Suttles. (2004). J. Cd40-mediated activation of vascular smooth muscle cell chemokine production through a src-initiated, mapk-dependent pathway. *Cell Signal.*;16:375-384
270. Matthies KM, Newman JL, Hodzic A, Wingett DG. (2006). Differential regulation of soluble and membrane cd40l proteins in t cells. *Cell Immunol.* ;241:47-58
271. Rothe M, Sarma V, Dixit VM, Goeddel DV. (1995). Traf2-mediated activation of nf-kappa b by tnf receptor 2 and cd40. *Science.*;269:1424-1427
272. Schonbeck U, Mach F, Sukhova GK, Murphy C, Bonnefoy JY, Fabunmi RP, Libby P.M. (1997). Regulation of matrix metalloproteinase expression in human vascular smooth muscle cells by t lymphocytes: A role for cd40 signaling in plaque rupture? *Circ Res.*;81:448-454
273. Miller DL, Yaron R, Yellin MJ. (1998). Cd40l-cd40 interactions regulate endothelial cell surface tissue factor and thrombomodulin expression. *J Leukoc Biol*;63:373-379
274. Zhou L, Stordeur P, de Lavarelle A, Thielemans K, Capel P, Goldman M, Pradier O. (1998). Cd40 engagement on endothelial cells promotes tissue factor-dependent procoagulant activity. *Thromb Haemost.*;79:1025-1028
275. Akiyama T, Shimo Y, Yanai H, Qin J, Ohshima D, Maruyama Y, Asaumi Y, Kitazawa J, Takayanagi H, Penninger JM, Matsumoto M, Nitta T, Takahama Y, Inoue J. (2008). The tumor necrosis factor family receptors rank and cd40 cooperatively establish the thymic medullary microenvironment and self-tolerance. *Immunity* ;29:423-437

276. Barbe-Tuana FM, Klein D, Ichii H, Berman DM, Coffey L, Kenyon NS, Ricordi C, Pastori RL. (2006). Cd40-cd40 ligand interaction activates proinflammatory pathways in pancreatic islets. *Diabetes*;55:2437-2445
277. Noss EH, Brenner MB.(2008). The role and therapeutic implications of fibroblast-like synoviocytes in inflammation and cartilage erosion in rheumatoid arthritis. *Immunol Rev.*;223:252-270
279. Kitagawa, H. Mitsui, H. Nakamura.(1999). “Differential regulation of rheumatoid synovial cell interleukin-12 production by tumor necrosis factor α and CD40 signals,” *Arthritis and Rheumatism*,9, 1917–1926.
280. Malik, B. W. Greenfield, A. F. Wahl, and P. A. Kiener. (1996). “Activation of human monocytes through CD40 induces matrix metalloproteinases,” *Journal of Immunology*, 10, 3952–3960.
281. Berner B, Wolf G, Hummel KM, Muller GA, Reuss-Borst MA.(2000). Increased expression of cd40 ligand (cd154) on cd4+ t cells as a marker of disease activity in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2000;59:190-195f
282. Durie FH, Fava RA, Foy TM, Aruffo A, Ledbetter JA, Noelle RJ. (1993). Prevention of collageninduced arthritis with an antibody to gp39, the ligand for cd40. *Science* ;261:1328-1330
283. Cho ML, Yoon CH, Hwang SY, Park MK, Min SY, Lee SH, Park SH, Kim HY. (2004). Effector function of type ii collagen-stimulated t cells from rheumatoid arthritis patients: Crosstalk between t cells and synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum*;50:776-784
284. Min DJ, Cho ML, Lee SH, Min SY, Kim WU, Min JK, Park SH, Cho CS, Kim HY. (2004). Augmented production of chemokines by the interaction of type ii

collagen-reactive t cells with rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum*;50:1146-1155

285. Lee HY, Jeon HS, Song EK, Han MK, Park SI, Lee SI, Yun HJ, Kim JR, Kim JS, Lee YC, Kim SI, Kim HR, Choi JY, Kang I, Kim HY, Yoo WH. (2006). Cd40 ligation of rheumatoid synovial fibroblasts regulates rankl-mediated osteoclastogenesis: Evidence of nf-kappabdependent, cd40-mediated bone destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*;54:1747-1758

286. Kitagawa, H. Suzuki, Y. Adachi, H. Nakamura, S. Yoshino, and T. Sumida.(2001). "Interferon- γ enhances interleukin 12 production in rheumatoid synovial cells via CD40-CD154 dependent and independent pathways," *Journal of Rheumatology*,28. 1764–1771.

287. McDyer,M. Dybul, T. J. Goletz. (2001)., "Differential effects of CD40 ligand/trimer stimulation on the ability of dendritic cells to replicate and transmit HIV infection: evidence for CC- chemokine-dependent and -independent mechanisms," *Journal of Immunology*. 3711–3717.

288. Yellin, S. Winikoff, S. M. Fortune. (1995). "Ligation of CD40 on fibroblasts induces CD54 (ICAM-1) and CD106 (VCAM-1) up-regulation and IL-6 production and proliferation," *Journal of Leukocyte Biology*,2, 209–216

289. Wakeland EK, Liu K, Graham RR, Behrens TW. (2001). Delineating the genetic basis of systemic lupus erythematosus. *Immunity*;15:397-408

290. Desai-Mehta, A., Lu, L., Ramsey-Goldman, R., & Datta, S. K. (1996). Hyperexpression of CD40 ligand by B and T cells in human lupus and its role in pathogenic autoantibody production. *J Clin Invest*, 97(9), 2063-2073.

291. Katsiari, C. G., Liosis, S. N., Souliotis, V. L., Dimopoulos, A. M., Manoussakis, M. N., & Sfikakis, P. P. (2002). Aberrant expression of the

costimulatory molecule CD40 ligand on monocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol*, 103(1), 54-62.

292. Higuchi, T., Aiba, Y., Nomura, T., Matsuda, J., Mochida, K., Suzuki, M., . . . Tsubata, T. (2002). Cutting Edge: Ectopic expression of CD40 ligand on B cells induces lupus-like autoimmune disease. *J Immunol*, 168(1), 9-12.

293. Nagafuchi, H., Shimoyama, Y., Kashiwakura, J., Takeno, M., Sakane, T., & Suzuki, N. (2003). Preferential expression of B7.2 (CD86), but not B7.1 (CD80), on B cells induced by CD40/CD40L interaction is essential for anti-DNA autoantibody production in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol*, 21(1), 71-77.

294. Yellin, M. J., D'Agati, V., Parkinson, G., Han, A. S., Szema, A., Baum, D., . . . Chess, L. (1997). Immunohistologic analysis of renal CD40 and CD40L expression in lupus nephritis and other glomerulonephritides. *Arthritis Rheum*, 40(1), 124-134.

295. van Kooten, C., Gerritsma, J. S., Paape, M. E., van Es, L. A., Banchereau, J., & Daha, M. R. (1997). Possible role for CD40-CD40L in the regulation of interstitial infiltration in the kidney. *Kidney Int*, 51(3), 711-721.

296. Kato, K., Santana-Sahagun, E., Rassenti, L. Z., Weisman, M. H., Tamura, N., Kobayashi, S., . . . Kipps, T. J. (1999). The soluble CD40 ligand sCD154 in systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest*, 104(7), 947-955.

297. Vakkalanka, R. K., Woo, C., Kirou, K. A., Koshy, M., Berger, D., & Crow, M. K. (1999). Elevated levels and functional capacity of soluble CD40 ligand in systemic lupus erythematosus sera. *Arthritis Rheum*, 42(5), 871-881.

298. Early GS, Zhao W, Burns CM. (1996). Anti-cd40 ligand antibody treatment prevents the development of lupus-like nephritis in a subset of new zealand black x new zealand white mice. Response correlates with the absence of an anti-antibody response. *J Immunol*;157:3159-3164

299. Wang X, Huang W, Schiffer LE, Mihara M, Akkerman A, Hiromatsu K, Davidson A. (2003). Effects of anti-cd154 treatment on b cells in murine systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*;48:495-506
300. Peters AL, Plenge RM, Graham RR, Altshuler DM, Moser KL, Gaffney PM, Bishop GA. (2008). A novel polymorphism of the human cd40 receptor with enhanced function. *Blood* ;112:1863-1871
301. Tong AW, Papayoti MH, Netto G, Armstrong DT, Ordonez G, Lawson JM, Stone MJ. (2001). Growth-inhibitory effects of cd40 ligand (cd154) and its endogenous expression in human breast cancer. *Clin Cancer Res*;7:691-703
302. Baxendale AJ, Dawson CW, Stewart SE, Mudaliar V, Reynolds G, Gordon J, Murray PG, Young LS, Eliopoulos AG. (2005). Constitutive activation of the cd40 pathway promotes cell transformation and neoplastic growth. *Oncogene* ;24:7913-7923
303. van den Oord JJ, Maes A, Stas M, Nuyts J, Battocchio S, Kasran A, Garmyn M, De Wever I, De Wolf-Peeters C. (1996). Cd40 is a prognostic marker in primary cutaneous malignant melanoma. *Am J Pathol.*;149:1953-1961
304. Bussolati, B., Russo, S., Deambrosis, I., Cantaluppi, V., Volpe, A., Ferrando, U., & Camussi, G. (2002). Expression of CD154 on renal cell carcinomas and effect on cell proliferation, motility and platelet-activating factor synthesis. *Int J Cancer*, 100(6), 654-661.
305. Roselli, M., Mineo, T. C., Basili, S., Martini, F., Mariotti, S., Aloe, S., . . . Ferroni, P. (2004). Soluble CD40 ligand plasma levels in lung cancer. *Clin Cancer Res*, 10(2), 610-614.

306. Mielczarek-Palacz, A., Sikora, J., Kondera-Anasz, Z., & Hauza, G. (2013). Imbalance in serum soluble CD30/CD30L and CD40/CD40L systems are associated with ovarian tumors. *Hum Immunol*, 74(1), 70-74.
307. Younes, A., Snell, V., Consoli, U., Clodi, K., Zhao, S., Palmer, J. L., . . . Andreeff, M. (1998). Elevated levels of biologically active soluble CD40 ligand in the serum of patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*, 100(1), 135-141.
308. Hassan, G.S., J. Stagg, and W. Mourad. (2015). Role of CD154 in cancer pathogenesis and immunotherapy. *Cancer Treat Rev*. 41(5):431-40.
309. Bereznaya, N.M. and V.F. Chekhun. (2007). Expression of CD40 and CD40L on tumor cells: the role of their interaction and new approach to immunotherapy. *Exp Oncol*.29(1):2-12.
310. Szocinski JL, Khaled AR, Hixon J, Halverson D, Funakoshi S, Fanslow WC, Boyd A, Taub DD, Durum SK, Siegall CB, Longo DL, Murphy WJ.(2002). Activation-induced cell death of aggressive histology lymphomas by cd40 stimulation: Induction of bax. *Blood*;100:217-223.
311. Yamada E. (1957). The fine structure of the megakaryocyte in the mouse spleen. *Acta Anat (Basel)*;29:267-290
312. Turner, J.G. (2001). Anti-CD40 antibody induces antitumor and antimetastatic effects:the role of NK cells. *J Immunol*. 166(1):89-94.
313. Jin H, Varner J (2004) Integrins: roles in cancer development and as treatment targets. *Br J Cancer*, 90:561–565
314. Muschler JL, Horwitz AF (1991) Down-regulation of the chicken alpha 5 beta 1 integrin fibronectin receptor during development. *Development* 113:327–337

315. Francis SE, Goh KL, Hodivala-Dilke K, Bader BL, Stark M, Davidson D et al (2002) Central roles of $\alpha 5 \beta 1$ integrin and fibronectin in vascular development in mouse embryos and embryoid bodies. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1(22):927–933
316. Kim S, Bell K, Mousa SA, Varner JA (2000) Regulation of angiogenesis in vivo by ligation of integrin $\alpha 5 \beta 1$ with the central cell-binding domain of fibronectin. *Am J Pathol* 156:1345–1362
317. Adil MM, Levine RM, Kokkoli E (2014) Increasing cancer-specific gene expression by targeting overexpressed $\alpha 5 \beta 1$ integrin and upregulated transcriptional activity of NF- κ B. *Mol Pharm* 11(3):849–858
318. Florence Schaffner, Anne Marie Ray, and Monique Dontenwill* *Am J Respir Cell Mol Biol.* (2010). Integrin $\alpha 5 \beta 1$, the Fibronectin Receptor, as a Pertinent Therapeutic Target in Solid Tumors. *Epub*, 43(6):684-91.
319. Roman, J., Ritzenthaler, J. D., Roser-Page, S., Sun, X., & Han, S. (2010). $\alpha 5 \beta 1$ -integrin expression is essential for tumor progression in experimental lung cancer. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 43(6), 684-691.
320. Korah, R., Boots, M., & Wieder, R. (2004). Integrin $\alpha 5 \beta 1$ promotes survival of growth-arrested breast cancer cells: an in vitro paradigm for breast cancer dormancy in bone marrow. *Cancer Res*, 64(13), 4514-4522.
321. Nakayamada S, Saito K, Nakano K, Tanaka Y. (2007). Activation signal transduction by $\beta 1$ integrin in T cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 56(5):1559-1568.
322. Walle TK, Helve T, Virtanen I, Kurki P. (1994). Increased expression of VLA-5 adhesion molecules on synovial fluid T lymphocytes in chronic polyarthritis: a consequence of T-cell activation. *Scand J Immunol*, 39(2):189-194.
323. Eguchi K. (2001). Apoptosis in autoimmune diseases, *Intern Med* 40,275-284.

324. Talaat, R. M., Mohamed, S. F., Bassyouni, I. H., & Raouf, A. A. (2015). Th1/Th2/Th17/Treg cytokine imbalance in systemic lupus erythematosus (SLE) patients: Correlation with disease activity. *Cytokine*, 72(2), 146-153.
325. Apostolidis, S. A., Crispin, J. C., & Tsokos, G. C. (2011). IL-17-producing T cells in lupus nephritis. *Lupus*, 20(2), 120-124.
326. Dolff, S., Bijl, M., Huitema, M. G., Limburg, P. C., Kallenberg, C. G., & Abdulahad, W. H. (2011). Disturbed Th1, Th2, Th17 and T(reg) balance in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol*, 141(2), 197-204.
327. W. Held, R.A. Mariuzza, Cis-trans interactions of cell surface receptors: biological roles and structural basis, *Cell Mol Life Sci* 68 (2011) 3469-3478.
328. M.A. Doucey, L. Scarpellino, J. Zimmer, P. Guillaume, I.F. Luescher, C. Bron, W. Held, Cis association of Ly49A with MHC class I restricts natural killer cell inhibition, *Nat Immunol* 5 (2004) 328-336
329. Ai Masuda, Akira Nakamura, Tsutomu Maeda, Yuzuru Sakamoto, and Toshiyuki Takai. (2007). Cis binding between inhibitory receptors and MHC class I can regulate mast cell activation. . *JEM*, 907–920.
330. Liat Haklai-Topper, Guy Mlechkovich, Dana Savariego, Irena Gokhman and Avraham Yaron. (2010). Cis interaction between Semaphorin6A and Plexin-A4 modulates the repulsive response to Sema6A. *The EMBO Journal*, 29, 2635–2645
331. G. Saggu, K. Okubo, Y. Chen, R. Vattepu, N. Tsuboi, F. Rosetti, X. Cullere, N. Washburn, S. Tahir, A.M. Rosado, S.M. Holland, R.M. Anthony, M. Sen, C. Zhu, T.N. Mayadas. (2018). Cis interaction between sialylated FcγRIIA and the αI-domain of Mac-1 limits antibody-mediated neutrophil recruitment, *Nat Commun* 9, 5058.